

ENGLISH - ESPAÑOL

Ref: RTB25CL
RTB25CLC
RTB25CLCN



biotical

Calprotectin + Lactoferrin Card

Rapid Test to detect
Calprotectin +
Lactoferrin in card
format

Prueba rápida para la
detección de
Calprotectina +
Lactoferrina en formato
de tarjeta.

biotical health
ready to test

ISO 13485 CERTIFIED
MEDICAL DEVICE
QUALITY MANAGEMENT SYSTEM



biotical

ENGLISH

Calprotectin + Lactoferrin Card

WHAT IS BIOTICAL CALPROTECTIN + LACTOFERRIN CARD?

biotical Calprotectin + Lactoferrin card is a coloured chromatographic immunoassay test (qualitative cut off test) for the simultaneous detection of Human Calprotectin (hCp) and Human Lactoferrin (hLf) in stool samples. Thanks to its easy handling and high sensitivity, the healthcare professional will be able to make a presumptive diagnosis and detect gastrointestinal inflammation present in various pathologies.

GASTROINTESTINAL INFLAMMATION, CALPROTECTIN AND LACTOFERRIN

Human Calprotectin (hCp) is a calcium-associated protein that has bacteriostatic and fungicidal properties. In inflammatory processes their plasma levels rise considerably, with high levels of hCp being found in the faeces of patients with various inflammatory bowel diseases (IBD), such as Crohn's disease and ulcerative colitis. This faecal hCp assay is useful for differentiating an Inflammatory Bowel Disease (IBD) from functional Irritable Bowel Syndrome (IBS). hCp, once released until its degradation, remains stable at ambient temperature for 7 days in the faeces, thus being an ideal analyte. This is because it is extremely resistant to proteolytic degradation (proteolysis).

Human Lactoferrin (hLf) is a glycoprotein that is present in secreted fluids such as saliva, tears and breast milk, and acts as a non-specific defense protein. When inflammation occurs in the gastrointestinal tract, hLf is released to prevent bacterial growth by limiting the availability of iron and causing direct damage to the cell membrane in cooperation with lysozymes. Its effect is increased by the presence of specific IgA antibodies secreted directly against bacteria.

hLf is elevated in faeces of patients with Inflammatory Bowel Diseases (IBD), such as ulcerative colitis, Crohn's disease and other pathologies characterized by idiopathic and chronic inflammation that affects the gastrointestinal tract. Paediatric patients and adults with IBD may have a wide variety of clinical symptoms (including abdominal pain and diarrhoea) that may be non-specific.

biotical Calprotectin + Lactoferrin card is a simple, non-invasive test, easy to use and with almost immediate results, based on the detection of Human Calprotectin and Human Lactoferrin in stool samples. This serves to distinguish patients with inflammation (invasive bacterial infection, IBD, etc.) from those without inflammation (viral, toxigenic, etc.). In addition, the determination of faecal Human Calprotectin and Human Lactoferrin concentrations may be useful for predicting imminent clinical recurrence in various IBD. Considering that children need general anaesthesia for colonoscopies, the benefits will be even greater.

TABLE OF REFERENCES

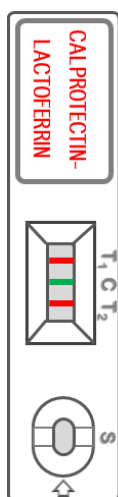
In the following table will be able to find all the product references related to the acquired test.

REFERENCE	NAME	CONTENT
RTB25CL	biotical Calprotectin + Lactoferrin Card	25 tests without positive or negative controls.
RTB25CLC	biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (+PC)	25 tests with positive control, without negative control.
RTB25CLCN	biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (+PC +NC)	25 tests with positive and negative control.

HOW DOES BIOTICAL CALPROTECTIN+LACTOFERRIN CARD WORK?

The card contains inside a test strip with a nitrocellulose membrane that has been previously precoated with:

- In **RED T₁ line (Calprotectin)**: with mouse monoclonal antibodies against human Calprotectin (hCp).
- In **GREEN C line (Control)**: with rabbit polyclonal antibodies against a specific protein.
- In **RED T₂ line (Lactoferrin)**: with mouse monoclonal antibodies against human Lactoferrin (hLf).
- **Sample area (S)**: The pad where the sample is placed has been dispensed with a preparation of reagents of the T1 line (mouse monoclonal antibodies against human Calprotectin) conjugated with latex of red polystyrene; with another preparation of reagents of the T2 line (mouse monoclonal antibodies against hLf) conjugated to red polystyrene latex; and with another preparation for the control solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming three conjugate coloured complexes.



TEST LINES:

If the sample is positive: the antigens of the patient's stool sample will react with one (or both) of the red coloured conjugate complexes (anti-human Calprotectin monoclonal antibodies-latex red microspheres for the line T1 and anti- human Lactoferrin monoclonal antibodies-red latex microspheres for the line T2) and it will advance by capillary through the membrane. As the sample migrates, so do the conjugate complexes. The antibodies anti-human Calprotectin present in the T1 line and / or the antibodies anti-human Lactoferrin present in the T2 line will capture the complex giving rise in a red line.

If the sample is negative: If the sample is negative and therefore does not contain antigens (or the antigen is present in a concentration below the detection limit), there is no reaction with the red coloured complexes. The anti-human Calprotectin and anti-human Lactoferrin antibodies present in the T1 and T2 line will not capture the red coloured antigen-complex (not formed) and the red lines will not appear.



CONTROL LINE (C):

Regardless of whether the sample is positive or not, to verify that the test has been performed correctly (sufficient sample volume, appropriate flow, internal control of the reagents, etc.) the mixture will continue moving through the membrane towards the immobilized antibodies against the specific protein located in the control line (C). These specific anti-protein antibodies present in the membrane will capture the control conjugate complex and the green control line will always appear.

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.

GENERAL 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 test and samples 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 provided in the kit are approved for use in the test that are supplied. Do not use any other commercial kit component if compatibility is not specified.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.
- Pale yellow or orange bands may appear in the test strip results window, at the positions where the coloured test and control lines should appear, before the test is performed. These bands are completely normal and correspond to the capture antibodies of the test. The existence of these bands does not alter the state of conservation and functionality of the kit.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- Cassette or Test Card.
- Instructions for use.
- Collection tubes with diluent.
- Positives Controls (only RTB25CLC & RTB25CLCN references).
- Negative Control (only RTB25CLCN reference).

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container.
- Disposable gloves.
- Timer.

The kit contains materials for the analysis of a maximum of 25 samples or controls.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

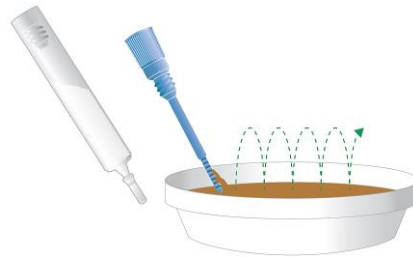
Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 7 days prior to testing. For longer storage, maximum 6 months, the specimen must be kept frozen -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before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

Specimen preparation (see illustration):

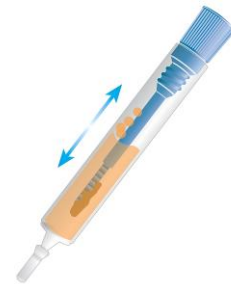
- Take out the cap of the stool collection tube and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample ①, to collect faecal sample and add it to the stool collection tube. For liquid samples, add approx. 20µL in the stool collection tube using a micropipette.
- Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion ②. The stool collection tube with dilute sample can be stored for 7 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.



Collection tube



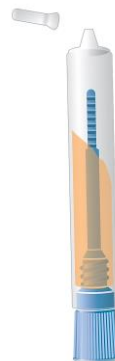
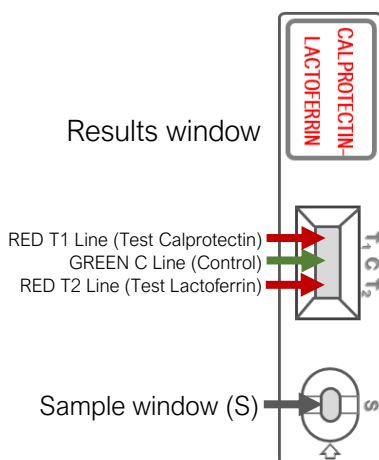
① Stool sample



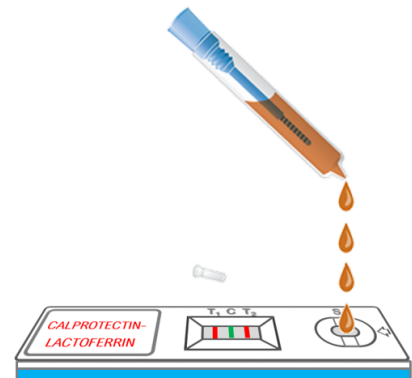
② Shake vigorously

TEST PROCEDURE

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



③ Cut the end of the cap.



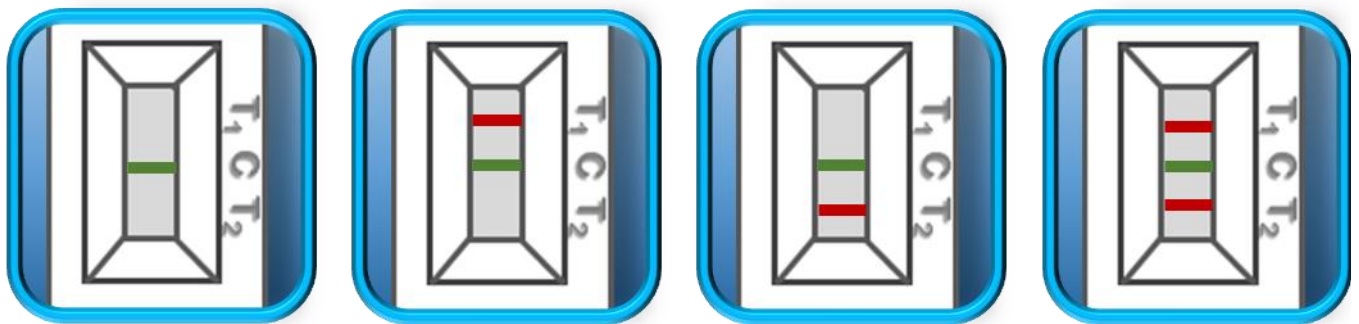
④ Add 4 drops in the circular window (S).

- Proceed to **shake the stool collection tube** in order to assure good sample dispersion.
- Remove the test card from its sealed bag just before using it.
- Take the stool collection tube, **cut the end of the cap** 3.
- **Dispense 4 drops** from the testing tube in the circular window marked with the letter S 4. Avoid adding solid particles with the liquid.
- **Read the results at 10 minutes.** The results will not be valid after 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.

INTERPRETATION OF RESULTS

(Please refer to the illustration below)

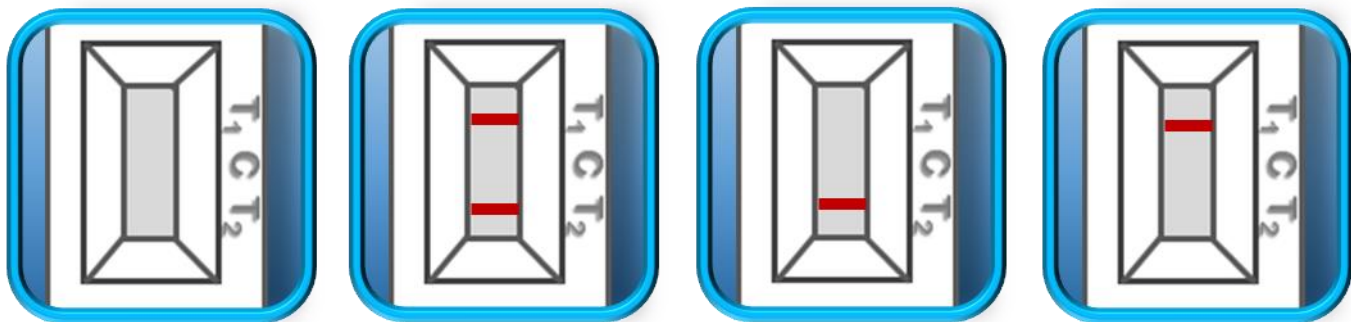


CALPROTECTIN NEGATIVE
LACTOFERRIN NEGATIVE

CALPROTECTIN POSITIVE
LACTOFERRIN NEGATIVE

CALPROTECTIN NEGATIVE
LACTOFERRIN POSITIVE

CALPROTECTIN POSITIVE
LACTOFERRIN POSITIVE



INVALID

INVALID

INVALID

INVALID

	biotal Test	Interpretation of the results
1	T1 = NO LINE C = GREEN LINE T2 = NO LINE	NEGATIVE FOR CALPROTECTIN & LACTOFERRIN Only the GREEN line appears across the results window in the site marked with the letter C (control line). No presence of Calprotectin (hCp) or Lactoferrin (hLf) are detected in the sample.
2	T1 = RED LINE C = GREEN LINE T2 = NO LINE	POSITIVE FOR CALPROTECTIN – NEGATIVE FOR LACTOFERRIN In addition to the GREEN control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T1 (hCp detection line) in the results window. Calprotectin (hCp) presence is detected in the sample. No presence of Lactoferrin (hLf) is detected.

	biotical Test	Interpretation of the results
3	T1 = NO LINE C = GREEN LINE T2 = RED LINE	POSITIVE FOR LACTOFERRIN – NEGATIVE FOR CALPROTECTIN In addition to the GREEN control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T2 (hLf detection line) in the results window. Lactoferrin (hLf) presence is detected in the sample. No presence of Calprotectin (hCp) is detected.
4	T1 = RED LINE C = GREEN LINE T2 = RED LINE	POSITIVE FOR CALPROTECTIN & LACTOFERRIN In addition to the GREEN control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T1 (hCp detection line) and a RED line appears in the site marked with the letter T2 (hLf detection line) in the results window. Calprotectin (hCp) and Lactoferrin (hLf) presence are detected in the sample.
5-8	Any other result	INVALID Total absence of the control line (GREEN) regardless the appearance or not of any test line (RED) causes an invalid result. Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the result still persists, 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 (T1 – T2) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural control is included in the test. A green line appearing in the control line (C) in the results window as an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

The following sections (**POSITIVE CONTROL** & **NEGATIVE CONTROL**) only apply if the corresponding positive and negative controls are available (sold separately or with kits references **RTB25CLC** & **RTB25CLCN**).

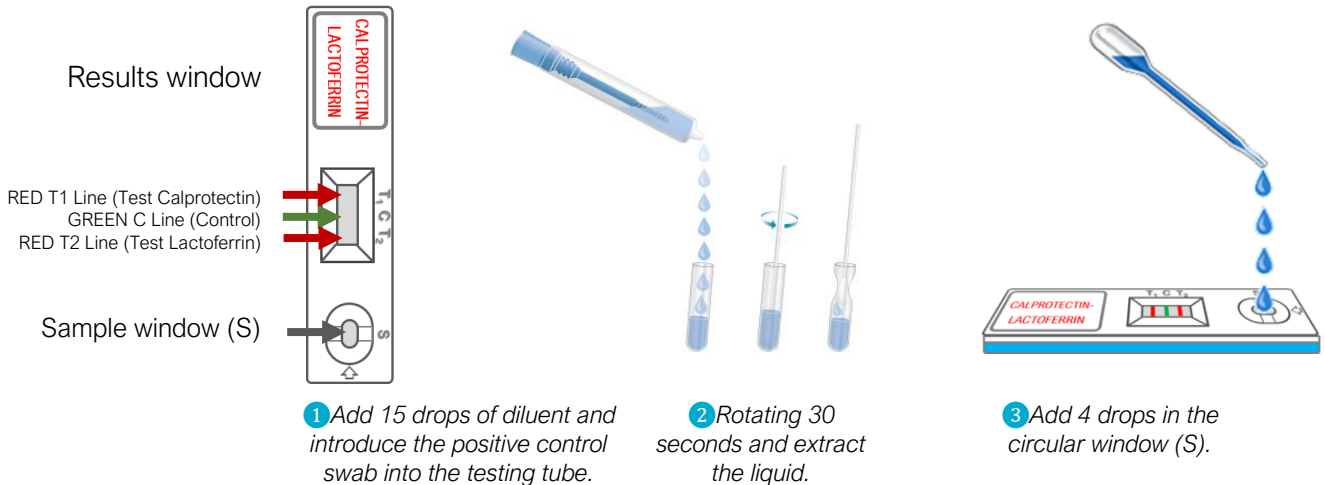
POSITIVE CONTROLS: INTENDED USE & COMPOSITION

The biotical Calprotectin Positive Control and biotical Lactoferrin Positive Control are two external quality controls for biotical Calprotectin + Lactoferrin card. Use these control swabs to check that the sample reagents and the test card are working properly.

biotical Calprotectin Positive Control: calprotectin extract dried in swab containing a preservative. biotical Lactoferrin Positive Control: lactoferrin extract dried in swab containing a preservative.



POSITIVE CONTROL: TESTING PROCEDURE

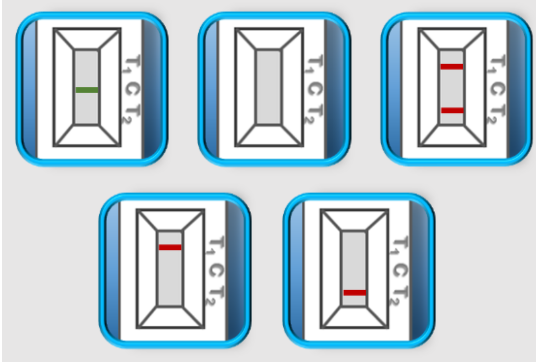
Allow tests and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open the package until the performance of the assay.



- Add 15 drops of diluent and immediately introduce the positive control swab into the testing tube 1.
- Mix the solution by rotating the positive control swab forcefully against the side of the testing tube at least 30 seconds 2. Extract as much liquid as possible from the swab, squeezing the sides of the testing tube as the swab is withdrawn. Discard the swab.
- Remove the biological device from its sealed bag just before using it.
- Use a separate pipette and test for each control. Dispense 4 drops from the testing tube in the circular window marked with the letter S 3.
- Read the result at 10 minutes. do not read the test result later than 10 minutes.

POSITIVE CONTROL – INTERPRETATION OF RESULTS

biological Test	Interpretation of the results
 <p>T1 = RED LINE C = GREEN LINE T2 = NO LINE</p>	<p>RESULT: CALPROTECTIN POSITIVE CONTROL.</p> <p>A GREEN line (C) and a RED line (T1) appear across the results window during the test performance due to presence of the positive control swab.</p>
 <p>T1 = NO LINE C = GREEN LINE T2 = RED LINE</p>	<p>RESULT: LACTOFERRIN POSITIVE CONTROL.</p> <p>A GREEN line (C) and a RED line (T2) appear across the results window during the test performance due to presence of the positive control swab.</p>



INVALID RESULTS FOR POSITIVE CONTROL.

Total absence of the control line (GREEN), regardless the appearance or not of any of the test lines (RED), or only appears the control line.

Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the control with a new test and a new positive control swab.

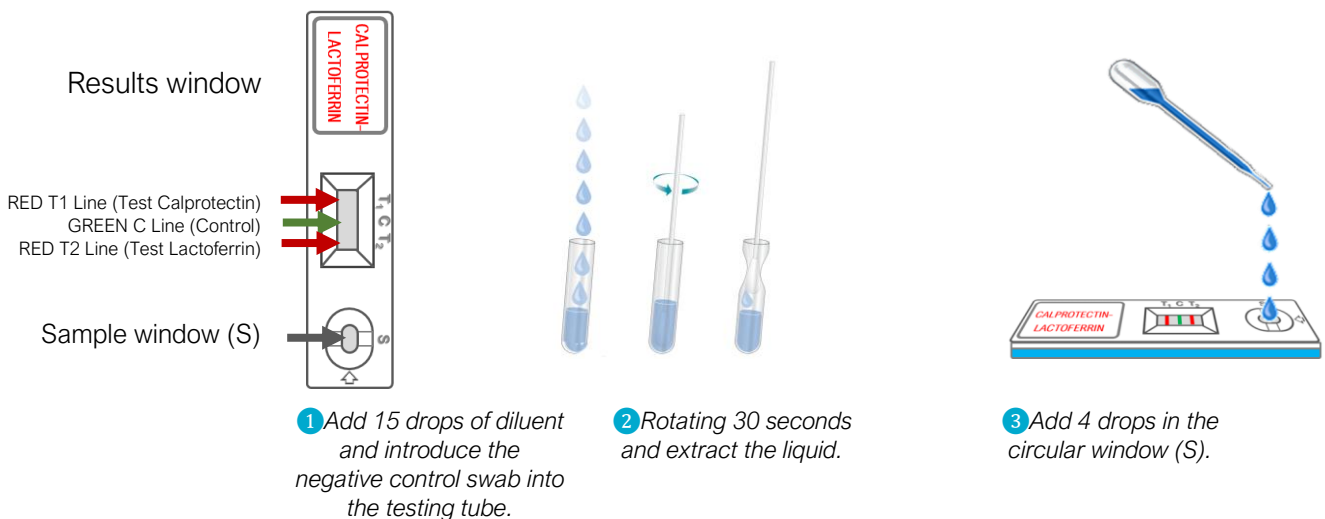
NEGATIVE CONTROL: INTENDED USE & COMPOSITION

The biotal Negative Control is an external quality control for all immunochromatographic tests manufactured by biotal. Use this control swab to check that the extraction reagents and the test are working properly.

biotal Negative Control is manufactured with negative control buffer dried in swab containing a preservative.


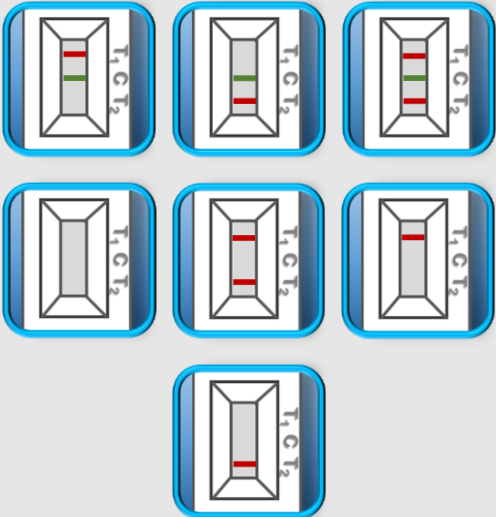
NEGATIVE CONTROL: TESTING PROCEDURE

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



- **Add 15 drops of diluent** and immediately introduce the negative control swab into the testing tube **1**.
- Mix the solution by **rotating the negative control swab** forcefully against the side of the testing tube at least **30 seconds** **2**. Extract as much liquid as possible from the swab, squeezing the sides of the testing tube as the swab is withdrawn. Discard the swab.
- Remove the biotal device from its sealed bag just before using it.
- Use a separate pipette and test for each control. **Dispense 4 drops** from the testing tube in the circular window marked with the letter S **3**.
- **Read the result at 10 minutes**. do not read the test result later than 10 minutes.

NEGATIVE CONTROL: INTERPRETATION OF RESULTS

biotical Test	Interpretation of the results
 <p>T1 = NO LINE C = GREEN LINE T2 = NO LINE</p>	<p>RESULT: CONTROL NEGATIVE.</p> <p>Only the control line (C) appears across the results window during the test performance.</p>
	<p>RESULT: INVALID FOR NEGATIVE CONTROL.</p> <p>Total absence of the control line, and/or the card shows the test line. Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are the main reasons for control line failure.</p> <p>Review the procedure and repeat the control with a new test and a new negative control swab.</p>

LIMITATIONS OF THIS TEST

- The test must be carried out up to 2 hours after opening the bag that contains it.
- Poorly defined brown lines may appear. These lines are caused by insufficient dilution of the sample and have no diagnostic value. In case of occur, the test should be repeated in a new cassette, increasing the dilution factor of the sample.
- The test has been validated with human faecal samples. Its use with samples from another source (non-faecal or non-human) has not been tested so is not recommended. Proper sampling is essential to ensure the validity of the test results.
- A positive test result confirms the presence of Calprotectin and/or Lactoferrin in the sample, without determining its origin (IBD, colorectal cancer, enteropathies, etc.). To confirm inflammatory bowel disease, it is necessary for a specialist to evaluate the results together with the patient's clinical evidence. In order to issue a valid clinical diagnosis, it is necessary to confirm the results of the tests by invasive diagnostic techniques (endoscopy or biopsy).
- False positives may occur in the test in samples from patients previously treated with non-inflammatory steroids (may cause positive Calprotectin results) or infants and new-borns (may cause positive Lactoferrin results), bloody samples or mucous stools (could cause Positive Calprotectin and Lactoferrin results from nonspecific reactions). The use of the test in this class of samples is not recommended.

- If a negative test result is obtained and symptoms persist, it is advisable to repeat the test after a few days. Negative test results may be inconclusive and invasive techniques are required for confirmation. A negative result does not indicate absence of intestinal inflammation. It is possible to appear false negatives by not reaching the detection limit of the test.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity (detection limit).

Cut-off values of biotical 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 (biotical Calprotectin + Lactoferrin Card, biotical) and others commercial immunoassays (Calprest®, Eurospital, and IBD EZ VUE®, TechLab®).

The results for hCp were as follows:

		Calprest®, Eurospital (immunochromatographic)		
		+	-	Total
Biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (T1: CALPROTECTIN)	+	34	2	36
	-	2	26	28
	Total	36	28	64

<i>Biotical Calprotectin + Lactoferrin Card vs Calprest®, Eurospital (CALPROTECTIN)</i>	MEAN VALUE	95% CONFIDENCE INTERVAL
SENSITIVITY	94,4%	81,3% - 99,3%
SPECIFICITY	92,9%	76,5% - 99,1%
PPV	94,4%	81,7% - 98,5%
NPV	92,9%	77,1% - 98,1%
ACCURACY	93,8%	84,8% - 98,3%

The results for hLf were as follows:

		IBD EZ VUE®, TechLab® (immunochromatographic)		
		+	-	Total
Biotal Calprotectin + Lactoferrin Card (T2: LACTOFERRIN)	+	20	0	20
	-	0	44	44
	Total	20	44	64

<i>Biotal Calprotectin + Lactoferrin Card vs IBD EZ VUE®, TechLab® (LACTOFERRIN)</i>	MEAN VALUE	95% CONFIDENCE INTERVAL
SENSITIVITY	>99,9%	83,16% - 100,00%
SPECIFICITY	>99,9%	91,96% - 100,00%
PPV	>99,9%	-
NPV	>99,9%	-
ACCURACY	>99,9%	94,40% - 100,00%

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

CROSS REACTIVITY

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of biotal Calprotectin + Lactoferrin Card; no cross reactivity against other faecal markers occasionally present in faeces:

Bovine and pig haemoglobin
Human haemoglobin

Bovine and pig transferrin
Human lactoferrin (T1 Line)

Human calprotectin (T2 Line)
Human transferrin

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS & REAGENTS



In vitro diagnostic device



Consult instructions for use



Keep dry



Use by



Temperature limitation



Manufacturer



Contains sufficient for <n> test



Sample diluent



Batch code



Catalogue number

biotical

ESPAÑOL

Calprotectin + Lactoferrin Card

¿PARA QUÉ SE USA BIOTICAL CALPROTECTIN + LACTOFERRIN CARD?

biotical Calprotectin + Lactoferrin Card es una prueba rápida de inmunocromatografía (test cualitativo de cut-off) para la detección de Calprotectina humana (hCp) y Lactoferrina humana (hLf) simultáneamente en muestras de heces. Gracias a su fácil manejo y su alta sensibilidad, el profesional sanitario podrá realizar un diagnóstico sencillo y detectar inflamación gastrointestinal presente en diversas patologías.

INFLAMACIÓN GASTROINTESTINAL, CALPROTECTINA Y LACTOFERRINA

La Calprotectina humana (hCp) es una proteína asociada al calcio que presenta propiedades bacteriostáticas y fungicidas. En procesos inflamatorios, sus niveles plasmáticos se elevan de manera considerable, encontrándose niveles elevados de hCp en las heces de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tales como, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Este ensayo de hCp fecal es útil para diferenciar una Enfermedad Intestinal Inflamatoria (EII) de la funcional (SII, Síndrome de Intestino Irritable). La hCp, una vez liberada hasta su degradación, se mantiene estable a temperatura ambiente durante 7 días en las heces, siendo por ello un analito ideal. Esto es debido a que es extremadamente resistente a la degradación proteolítica (proteólisis).

La Lactoferrina humana (HLf) es una glucoproteína que está presente en los fluidos secretados tales como saliva, lágrimas y leche materna, y actúa como proteína de defensa no específica. Cuando una inflamación se produce en el tracto gastrointestinal, se libera hLf para impedir el crecimiento bacteriano limitando la disponibilidad del hierro y causando daño directo a la membrana de las células en cooperación con las lisozimas. Su efecto se incrementa por la presencia de los anticuerpos IgA específicos secretados directamente frente a las bacterias.

La hLf se encuentra elevada en heces de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), tales como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y otras patologías caracterizadas por una inflamación idiopática y crónica que afecta al tracto gastrointestinal. Los pacientes pediátricos y adultos con IBD pueden presentar una gran variedad de síntomas clínicos (incluyendo dolor abdominal y diarrea) que pueden ser no-específicos.

biotical Calprotectin + Lactoferrin Card es una prueba simple, no invasiva, de fácil utilización y con resultados casi inmediatos, basada en la detección de Calprotectina humana y Lactoferrina humana en muestras de heces. Esto sirve para diferenciar pacientes con inflamación (infección bacteriana invasiva, IBD, etc.) de aquellos que no presentan inflamación (viral, toxigénica, etc.). Además, la determinación de las concentraciones de Calprotectina humana y Lactoferrina humana fecal puede ser útil para predecir la recidiva clínica inminente en diversas EII. Teniendo en cuenta que los niños necesitan anestesia general para las colonoscopias, las ventajas de esta prueba son aún mayores.

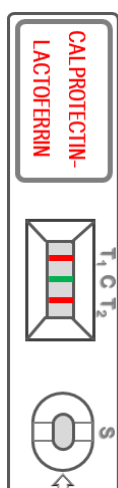
TABLA DE REFERENCIAS

En la siguiente tabla puede encontrar todas las referencias de productos relacionados con el test adquirido.

REFERENCIA	NOMBRE	CONTENIDO
RTB25CL	biotical Calprotectin + Lactoferrin Card	25 Test sin control positivo ni control negativo.
RTB25CLC	biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (+PC)	25 Test con control positivo, sin control negativo.
RTB25CLCN	biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (+PC +NC)	25 Test con control positivo y negativo.

¿CÓMO FUNCIONA BIOTICAL CALPROTECTIN+LACTOFERRINA CARD?

El casete (card) posee en su interior una tira reactiva con una membrana de nitrocelulosa que ha sido fijada previamente:



- En la línea **ROJA T₁ de test (Calprotectin)**: con anticuerpos monoclonales de ratón frente a Calprotectina humana (hCp).
- En la línea **VERDE C (Control)**: con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica.
- En la línea **ROJA T₂ de test (Lactoferrin)**: con anticuerpos monoclonales de ratón frente a Lactoferrina humana (hLf).
- En la **zona de muestra (S)**: una preparación de reactivos de la línea T1 (anticuerpos monoclonales de ratón frente a hCp) conjugados con látex de poliestireno rojo; otra preparación con reactivos de la línea T2 (anticuerpos monoclonales de ratón frente a hLf) conjugados con látex de poliestireno rojo; y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde; formando tres complejos coloreados conjugados.

LÍNEA DE TEST (T):

Si la muestra es positiva: los antígenos de la muestra de heces del paciente reaccionarán con alguno (o con ambos) de los complejos conjugados coloreados rojos (anticuerpos monoclonales anti-Calprotectina humana-microesferas rojas de látex para la línea T1 y anticuerpos monoclonales anti-Lactoferrina humana-microesferas rojas de látex para la línea T2) y avanzarán 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 línea de T1 y/o los anticuerpos anti-Lactoferrina humana presentes en la línea de T2 capturarán el complejo dando lugar a una línea roja.

Si la muestra es negativa: si la muestra es negativa y por lo tanto no contiene antígenos (o estos están presentes en una concentración inferior al límite de detección), no se producirá reacción con los complejos coloreados rojos. Los anticuerpos anti- Calprotectina humana y anti- Lactoferrina humana presentes en las líneas T1 y T2 no capturarán los antígenos-complejos coloreados y no aparecerán las líneas rojas.

LÍNEA DE CONTROL (C):

Independientemente de que la muestra sea positiva o negativa, para verificar que se ha realizado correctamente el test (volumen de muestra suficiente, flujo apropiado, control interno de los reactivos, etc.) la mezcla continuará moviéndose a través de la membrana hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en la línea de control (C). Estos anticuerpos antiproteína específica presentes en la membrana capturarán el complejo conjugado de control y la línea de control verde siempre aparecerá.

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 GENERALES

- 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 test y las muestras deben desecharse en un contenedor de residuos sanitarios adecuado después de su uso.
- Los reactivos contienen conservantes. Evite cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consulte la ficha de datos de seguridad, disponible bajo petición.
- Los componentes incluidos en el kit están aprobados para su uso en la prueba que se suministran. No utilice ningún otro componente de kit comercial si no se especifica la compatibilidad.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, use ropa protectora, use guantes de eliminación, gafas y máscara. No coma, beba ni fume en el área de trabajo.
- Es posible que aparezcan bandas color amarillo o naranja pálido en la ventana de resultados de las tiras de test, en las posiciones donde deberán aparecer las bandas coloreadas de test y control, antes de que se realice la prueba. Estas bandas son completamente normales y corresponde a los anticuerpos de captura de la prueba. La existencia de estas bandas no altera el estado de conservación y funcionalidad del kit.

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- Casete o tarjeta (Card) de test.
- Instrucciones de uso.
- Tubos para dilución de muestra con diluyente.
- Controles positivos (solo en las referencias RTB25CLC & RTB25CLCN).
- Control negativo (solo en la referencia RTB25CLCN).

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para recogida de muestras.
- Guantes desechables.
- Cronómetro.

El kit contiene materiales para el análisis de hasta 25 muestras o controles.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

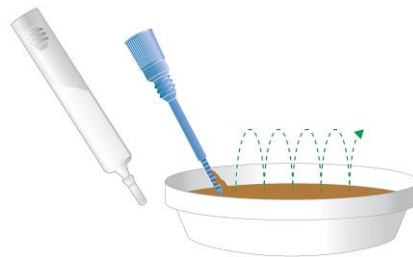
Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), máximo durante 7 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 6 meses, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra 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):

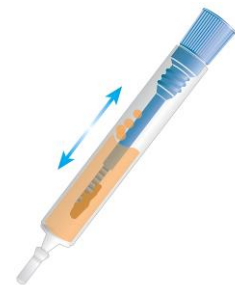
- Abrir el tubo para dilución de muestra y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra **1**, tomando una pequeña cantidad de heces y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Para muestras líquidas, añadir aprox. 20µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
- Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra **2**. Este tubo que contiene la muestra diluida puede conservarse en frío (2-8°C) durante 7 días antes de realizar la prueba.



Tubo para dilución de muestra



1 Muestra de heces



2 Agite vigorosamente

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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.



- Proceder a **agitar el tubo de recogida de heces** para asegurar una buena dispersión de la muestra.
- Retire la tarjeta de test (card) de su bolsa sellada justo antes de usarla.
- Tomar el tubo para dilución de muestra, **cortar la punta del tapón** 3.
- **Añadir 4 gotas** del tubo de ensayo en la ventana circular marcada con la letra S 4. Evite añadir partículas sólidas con el líquido.
- **Leer los resultados a los 10 minutos.** Los resultados no serán válidos después de 10 minutos.

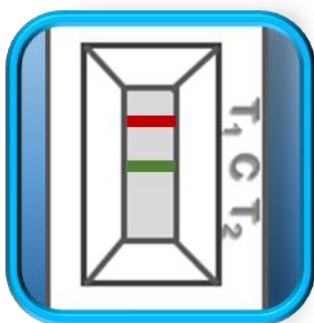
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

(Por favor fijese a la ilustración de abajo)



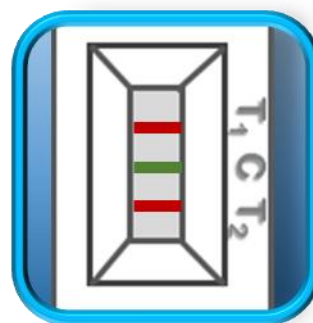
CALPROTECTINA NEGATIVA
LACTOFERRINA NEGATIVA



CALPROTECTINA POSITIVA
LACTOFERRINA NEGATIVA



CALPROTECTINA NEGATIVA
LACTOFERRINA POSITIVA



CALPROTECTINA POSITIVA
LACTOFERRINA POSITIVA



INVÁLIDO



INVÁLIDO



INVÁLIDO



INVÁLIDO

biotal Test		Interpretación de los resultados
1	T1 = SIN LÍNEA C = LÍNEA VERDE T2 = SIN LÍNEA	NEGATIVO PARA CALPROTECTINA & LACTOFERRINA Solo la línea VERDE aparece en la ventana de resultados, marcada con la letra C (línea de Control). No se detecta presencia de Calprotectina (hCp) o Lactoferrina(hLf) en la muestra.
2	T1 = LÍNEA ROJA C = LÍNEA VERDE T2 = SIN LÍNEA	POSITIVO PARA CALPROTECTINA – NEGATIVO PARA LACTOFERRINA Además de la línea de Control VERDE , aparece una línea color ROJO en el área marcada con T1 (Línea de test para Calprotectina). Se detecta presencia de Calprotectina (hTF) en la muestra. No se detecta presencia de Lactoferrina (hLf).
3	T1 = SIN LÍNEA C = LÍNEA VERDE T2 = LÍNEA ROJA	POSITIVO PARA LACTOFERRINA – NEGATIVO PARA CALPROTECTINA Además de la línea de Control VERDE , aparece una línea color ROJO en el área marcada con T2 (Línea de test para Lactoferrina). Se detecta presencia de Lactoferrina (hLf) en la muestra. No se detecta presencia de Calprotectina (hCp).
4	T1 = LÍNEA ROJA C = LÍNEA VERDE T2 = LÍNEA ROJA	POSITIVO PARA CALPROTECTINA&LACTOFERRINA Además de la línea de Control VERDE , aparecen una línea color ROJO en el área marcada con T1 (Línea de test para Calprotectina) y una línea color ROJO en el área marcada con T2 (Línea de test para Lactoferrina). Se detecta presencia de Calprotectina & Lactoferrina en la muestra.
5-8	Cualquier otro resultado	INVÁLIDO Ausencia total de la línea de control (VERDE)independientemente de la aparición o no de cualquier línea de test (ROJA) provoca un resultado no válido. Un volumen de muestra insuficiente, técnicas de procedimiento incorrectas o el deterioro de los reactivos son, en su mayoría, las razones principales de la ausencia de la línea de control. Revise el procedimiento y repita el ensayo con una nueva prueba. Si el resultado persiste, póngase en contacto con su distribuidor local.

NOTAS SOBRE LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La intensidad de la línea de color rojo en las líneas de test (T1 – T2) en la ventana de resultados variará dependiendo de la concentración de antígeno presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígeno pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

El test incluye un control interno de procedimiento. La línea verde que aparece en la línea de control (C) en la ventana de resultados es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

Las siguientes secciones (**CONTROL POSITIVO & CONTROL NEGATIVO**) solo se aplica si los controles positivo o negativo correspondiente están disponibles (vendidos por separado o con kits con referencias **RTB25CLC & RTB25CLCN**).

CONTROL POSITIVO: USO PREVISTO & COMPOSICIÓN

biotical Calprotectin Positive Control y biotical Lactoferrin Positive Control son dos controles positivos externos para usar en el test biotical Calprotectin + Lactoferrin Card. Use estos hisopos de control para verificar que los reactivos del kit y la tarjeta de test funcionen correctamente.

biotical Calprotectin Positive Control: extracto de calprotectina secado en un hisopo que contiene un conservante. biotical Lactoferrin Positive Control: extracto de lactoferrina secado en un hisopo que contiene un conservante.

CONTROL POSITIVO: PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Deje que los test y los controles alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba. No abra el envase del test hasta la realización del ensayo.

Ventana de resultados



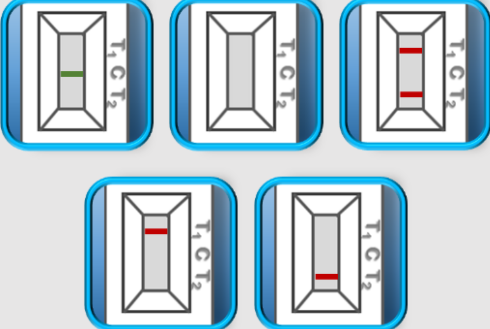
Linea ROJA T1 (Test Calprotectina)
Linea VERDE C (Control)
Linea ROJA T2 (Test Lactoferrina)

Ventana circular para la muestra (S)

- 1 Agregue 15 gotas de diluyente e introduzca el hisopo de control en el tubo de prueba.
- 2 Girar 30 segundos y escurrir el líquido.
- 3 Añadir 4 gotas en la ventana circular (S).

- **Añadir 15 gotas de diluyente.** Introduzca el hisopo de control en el tubo de prueba **1**.
- Mezcle la solución **girando el hisopo de control** con fuerza contra el lado del tubo de prueba al menos **30 segundos** **2**. Escurra tanto líquido como sea posible del hisopo, presionando los lados del tubo de prueba a medida que se retira el hisopo. Descartar el hisopo.
- Retire la tarjeta de test biotical correspondiente de su bolsa sellada justo antes de usarlo.
- Use una pipeta y prueba separada para cada control. **Dispense 4 gotas** desde el tubo de prueba en la ventana circular marcada con la letra S **3**.
- **Lea el resultado a 10 minutos.** Los resultados no serán válidos transcurridos 10 minutos.

CONTROL POSITIVO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

biotical Test	Interpretación de los resultados.
 <p>T1 = LÍNEA ROJA C = LÍNEA VERDE T2 = SIN LÍNEA</p>	<p>RESULTADO: CONTROL POSITIVO DE CALPROTECTINA</p> <p>Aparece una línea VERDE (C) y una línea ROJA (T1) en la ventana de resultados durante la realización de la prueba debido a la presencia de hisopo de control positivo.</p>
 <p>T1 = SIN LÍNEA C = LÍNEA VERDE T2 = LÍNEA ROJA</p>	<p>RESULTADO: CONTROL POSITIVO DE LACTOFERRINA</p> <p>Aparece una línea VERDE (C) y una línea ROJA (T2) en la ventana de resultados durante la realización de la prueba debido a la presencia de hisopo de control positivo.</p>
	<p>RESULTADO NO VÁLIDO</p> <p>Ausencia total de la línea de control (VERDE), independientemente de la aparición o no de alguna de las líneas de prueba T1-T2 (ROJA), o sólo aparece la línea de control.</p> <p>Técnicas de procedimiento incorrectas o el deterioro de los reactivos son, en su mayoría, las principales razones de la falla de la línea de control. Revise el procedimiento y repita el control con una nueva prueba y un nuevo hisopo de control positivo.</p>

CONTROL NEGATIVO: USO PREVISTO & COMPOSICIÓN

biotical Negative Control es un control de calidad externo para todas las pruebas inmunocromatográficas fabricadas por biotical. Use este hisopo de control para verificar que los reactivos de extracción y la prueba funcionen correctamente.

biotical Negative Control está fabricado con tampón de control negativo secado en hisopo, contiene un conservante.

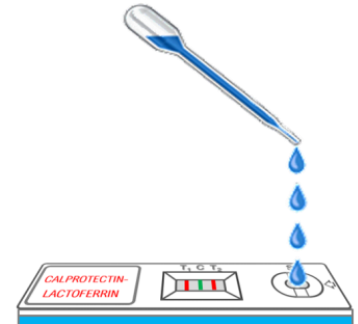
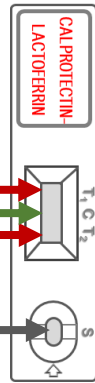
CONTROL NEGATIVO: PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Deje que los test y los controles alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba. No abra el envase del test hasta la realización del ensayo.

Ventana de resultados

Línea ROJA T1 (Test Calprotectina)
Línea VERDE C (Control)
Línea ROJA T2 (Test Lactoferrina)

Ventana circular para la muestra (S)




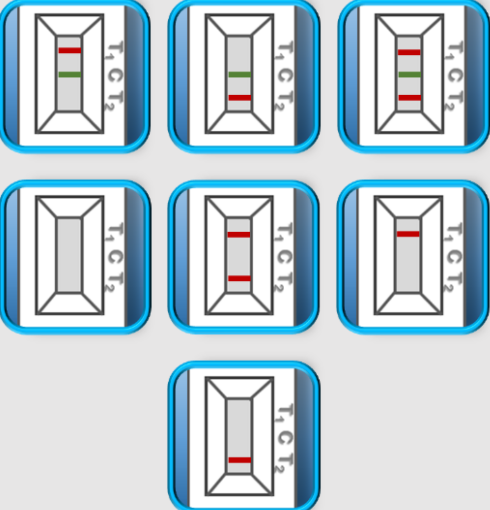
1 Agregue 15 gotas de diluyente e introduzca el hisopo de control en el tubo de prueba.

2 Girar 30 segundos y escurrir el líquido.

3 Añadir 4 gotas en la ventana circular (S).

- **Añadir 15 gotas de diluyente.** Introduzca el hisopo de control en el tubo de prueba 1.
- Mezcle la solución **girando el hisopo de control** con fuerza contra el lado del tubo de prueba al menos **30 segundos** 2. Escorra tanto líquido como sea posible del hisopo, presionando los lados del tubo de prueba a medida que se retira el hisopo. Descartar el hisopo.
- Retire la tarjeta de test biotical correspondiente de su bolsa sellada justo antes de usarlo.
- Use una pipeta y prueba separada para cada control. **Dispense 4 gotas** desde el tubo de prueba en la ventana circular marcada con la letra S 3.
- **Lea el resultado a 10 minutos.** Los resultados no serán válidos transcurridos 10 minutos.

CONTROL NEGATIVO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

biotical Test	Interpretación de los resultados.
 <p>T1 = NO HAY LÍNEA C = LÍNEA VERDE T2 = NO HAY LÍNEA</p>	<p>RESULTADO: CONTROL NEGATIVO</p> <p>Solo aparece la línea de control (C) en la ventana de resultados durante la prueba.</p>
	<p>RESULTADO NO VÁLIDO</p> <p>La ausencia total de la línea de control, y/o aparición de la línea de test. Técnicas de procedimiento incorrectas o deterioro de los reactivos son las razones principales de que no aparezca la línea de control.</p> <p>Revise el procedimiento y repita el control con una nueva prueba y un nuevo hisopo de control negativo.</p>

LIMITACIONES DEL PRESENTE TEST

- El test debe ser realizado como máximo hasta 2 horas después de haber abierto la bolsa que lo contiene.
- Es posible la aparición de líneas poco definidas de color pardo. Estas líneas son ocasionadas por una dilución insuficiente de la muestra y no poseen valor diagnóstico alguno. En caso de producirse, se deberá repetir el test en un nuevo casete, aumentando el factor de dilución de la muestra.
- El test ha sido validado con muestras fecales humanas. Su uso con muestras de otra procedencia (no fecales o no humanas) no ha sido probado por lo que no se recomienda su utilización. Una adecuada toma de muestras es primordial para asegurar la validez de los resultados del test.
- Un resultado positivo del test confirma la presencia Calprotectina y/o Lactoferrina en la muestra, sin determinar su origen (EII, IBD, cáncer colorrectal, enteropatías, etc). Para confirmar la enfermedad inflamatoria intestinal es necesario que un especialista evalúe los resultados junto con las demás evidencias clínicas del paciente. Para poder emitir un diagnóstico clínico válido es necesario confirmar los resultados del test mediante técnicas diagnósticas invasivas (endoscopia o biopsia).
- Pueden producirse falsos positivos en el test en muestras procedentes de pacientes previamente tratados con esteroideos no inflamatorios (podrán causar resultados Calprotectina positivos) o de lactantes y neonatos (podrían causar resultados Lactoferrina positivos), muestras sanguinolentas o heces mucosas (podrían causar resultados Calprotectina y Lactoferrina positivos por reacciones inespecíficas). No se recomienda el uso del test en esta clase de muestras.
- En caso de obtenerse un resultado negativo en el test y persistir los síntomas, es recomendable repetir la prueba transcurrido unos días. Los resultados negativos en el test pueden no ser concluyentes y requerirse el empleo de técnicas invasivas para su confirmación. Un resultado negativo no indica ausencia de inflamación intestinal. Es posible la aparición de falsos negativos por no alcanzar la muestra, el límite de detección del test.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad analítica (límite de detección).

Los valores de cut-off de biotal Calprotectin + Lactoferrin Card 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 (biotal Calprotectin + Lactoferrin Card, biotal) y otros inmunoensayos comercializados (Calprest®, Eurospital y IBD EZ VUE®, TechLab®).

Los resultados para hCp fueron los siguientes:

		Calprest®, Eurospital (inmunocromatográfica)		
		+	-	Total
Biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (T1: CALPROTECTINA)	+	34	2	36
	-	2	26	28
	Total	36	28	64

<i>Biotical Calprotectin + Lactoferrin Card vs Calprest®, Eurospital (CALPROTECTINA)</i>	VALOR MEDIO	95% INTERVALO DE CONFIANZA
SENSIBILIDAD	94,4%	81,3% - 99,3%
ESPECIFICIDAD	92,9%	76,5% - 99,1%
VPP	94,4%	81,7% - 98,5%
VPN	92,9%	77,1% - 98,1%
PRECISIÓN	93,8%	84,8% - 98,3%

Los resultados para hLf fueron los siguientes:

		IBD EZ VUE®, TechLab® (inmunocromatográfica)		
		+	-	Total
Biotical Calprotectin + Lactoferrin Card (T2: LACTOFERRINA)	+	20	0	20
	-	0	44	44
	Total	20	44	64

<i>Biotical Calprotectin + Lactoferrin Card vs IBD EZ VUE®, TechLab® (LACTOFERRINA)</i>	VALOR MEDIO	95% INTERVALO DE CONFIANZA
SENSIBILIDAD	>99,9%	83,16% - 100,00%
ESPECIFICIDAD	>99,9%	91,96% - 100,00%
VPP	>99,9%	-
VPN	>99,9%	-
PRECISIÓN	>99,9%	94,40% - 100,00%

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

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas del test biotical Calprotectin + Lactoferrin Card; no se detectó reacción cruzada con otros marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces.

Hemoglobina bovina y porcina
Hemoglobina humana

Transferrina bovina y porcina
Lactoferrina humana (Línea T1)

Calprotectina humana (Línea T2)
Transferrina humana

SÍMBOLOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS DE IVD



Producto para diagnóstico *in vitro*



Consultar las instrucciones de uso



Almacenar en lugar seco



Fecha de caducidad



Limitación de temperatura



Fabricante



Contiene <n> test

DIL

Diluyente de muestra

LOT

Número de lote

REF

Número de referencia





REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / RÉFÉRENCES /

1. Angriman I. et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. Feb 2007, p. 63-68 2.
2. Quail, M.A. et al. Fecal Calprotectin Complements Routine Laboratory Investigations in Diagnosing Childhood Inflammatory Bowel Disease. , 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. , 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. 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.



Sierra de Guadarrama, 1.
28830 San Fernando de Henares. Madrid
Tel.: + 34 91 677 43 08

info@biotical.es
www.biotical.es



biotical health S.L.U.

