

---

# CERTEST Calprotectin+ Lactoferrin

---

ONE STEP human calprotectin  
and human lactoferrin COMBO  
CARD TEST

---

CERTEST BIOTEC S.L.

---



## ESPAÑOL

### USO PREVISTO

CerTest Calprotectin+Lactoferrin combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección semi-cuantitativa 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 ( $\geq 4$  semanas) o recurrente ( $\geq 2$  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 semi-cuantitativa 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

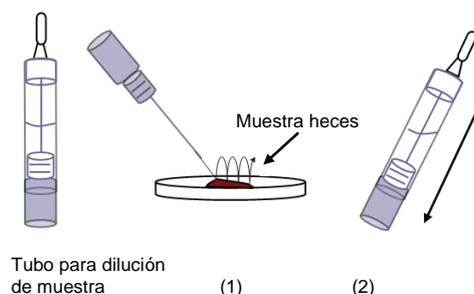
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- 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.
- 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 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 cantidad de heces y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Para muestras líquidas, añada aprox. 15µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. 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.



## MATERIALES

### MATERIALES SUMINISTRADOS

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

### MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

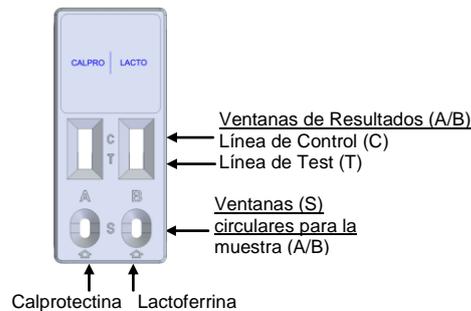
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

## 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.

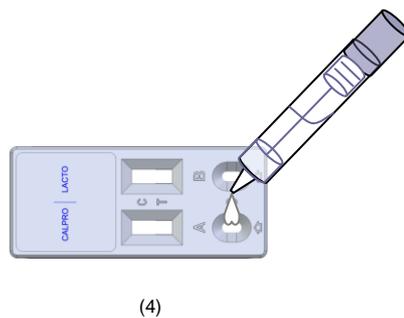
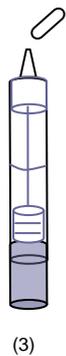
1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest Calprotectin+Lactoferrin de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo de dilución de muestra, cortar la punta del tapón (3) y añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (4), y añadir 4 gotas, con el mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (5), 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.



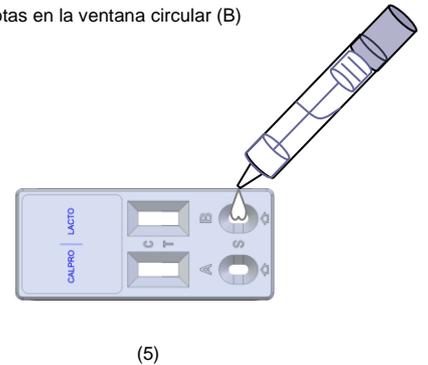
### Procedimiento para la tira A de Calprotectina

Añadir 4 gotas en la ventana circular (A)

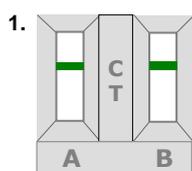


### Procedimiento para la tira B de Lactoferrina

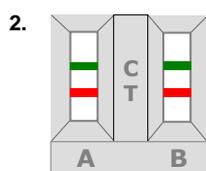
Añadir 4 gotas en la ventana circular (B)



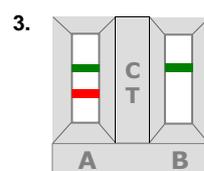
## INTERPRETACION DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



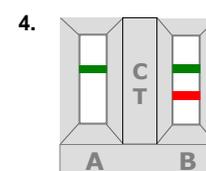
A: Verde → Negativo hCp  
B: Verde → Negativo hLf



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



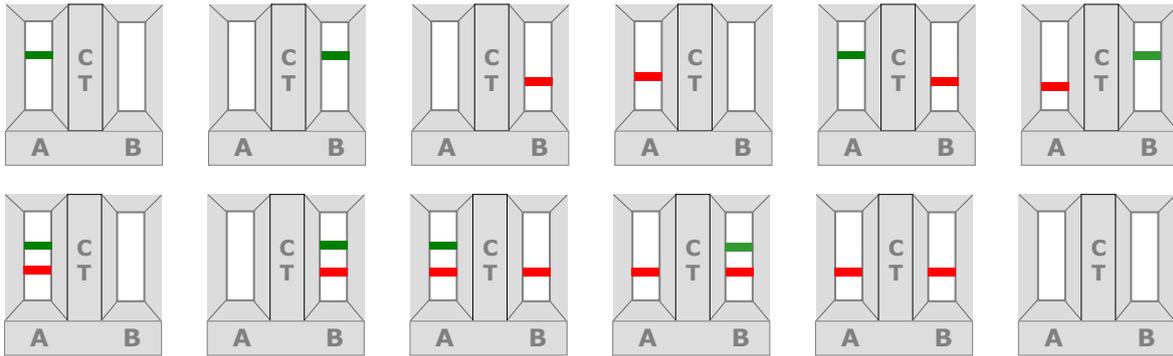
A: Verde/Rojo → Positivo hCp  
B: Verde → Negativo hLf



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



## 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*

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.

- 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.
- Heces de pacientes que sigan un tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) podrían dar resultados calprotectina positivos.
- La lactoferrina es un componente de la leche materna, este test dará positivo en lactantes y no debería utilizarse para evaluar neonatos lactantes.
- 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).
- 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.

### 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 otros inmunoensayos comercializados (Calprest®, Eurospital y IBD EZ VUE®, TechLab®). Los resultados se muestran a continuación:

		ELISA test: Calprest®		
		+	-	Total
IC test: CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Calprotectin)	+	34	2	36
	-	2	26	28
	Total	36	28	64

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

		IC test: IBD EZ VUE®		
		+	-	Total
IC test: CerTest Calprotectin+Lactoferrin (Lactoferrin)	+	20	0	20
	-	0	44	44
	Total	20	44	64





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

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 marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces:

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

### 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 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro	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

