



Modifiche: § 3, 4, 8, 9, 12, 16
Suppressioni: §

LIAISON® Calprotectin (REF 318960)

1. USO PREVISTO

Il dosaggio DiaSorin LIAISON® Calprotectin è un test diagnostico chemiluminescente (CLIA) *in vitro* per la determinazione quantitativa, in campioni di feci umane, della calprotectina fecale, una proteina presente nei neutrofili che funge da marcatore di infiammazione della mucosa. Il dosaggio LIAISON® Calprotectin può essere utilizzato come ausilio nella diagnosi di malattie infiammatorie intestinali (MII), in particolare morbo di Crohn e colite ulcerosa, nonché nella differenziazione tra MII e sindrome dell'intestino irritabile (SII). I risultati del test devono essere utilizzati in combinazione alle informazioni ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

Il test deve essere eseguito sulla linea di strumenti LIAISON® Analyzer*.

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La malattia infiammatoria intestinale (MII) è una patologia cronica che comprende la colite ulcerosa e il morbo di Crohn. I sintomi riferiti dai pazienti consistono in episodi cronici o ricorrenti di dolore addominale e diarrea. Le manifestazioni cliniche della MII sono aspecifiche e la sintomatologia è simile a quella di altre patologie non organiche, quali la sindrome dell'intestino irritabile (SII), pertanto, per confermare la diagnosi è necessario effettuare indagini endoscopiche. La misurazione non invasiva della calprotectina fecale è ritenuta un utile strumento di screening per differenziare la MII dalla SII⁽¹⁻³⁾.

La calprotectina è un eterocomplesso composto dalle proteine leganti il calcio e lo zinco S100A8 e S100A9. Costituisce oltre il 60% delle proteine totali presenti nel citosol dei neutrofili, che infiltrano la mucosa intestinale come parte della risposta infiammatoria. Di conseguenza, le patologie organiche dell'intestino presentano elevati livelli di calprotectina fecale^(1,3). La concentrazione di calprotectina nelle feci riflette il numero di neutrofili presenti e fornisce un indicatore del grado di severità dell'infiammazione intestinale⁽⁴⁻⁶⁾. La misurazione della calprotectina come parte della diagnosi (e del trattamento della malattia) di malattie intestinali organiche quali la MII è un parametro il cui impiego è in rapida crescita^(3,7).

I pazienti affetti da MII passano da fasi attive (infiammatorie) e inattive della malattia e viceversa. Nell'interpretazione dei risultati del dosaggio della calprotectina fecale occorre tenere conto di tali fasi. Altre patologie intestinali, incluse numerose infezioni gastrointestinali e il cancro coloretale, possono risultare in elevati livelli di calprotectina. Pertanto la formulazione di una diagnosi di MII attiva dovrebbe avvenire solo nel quadro di altri esami diagnostici e considerando lo stato clinico complessivo del paziente. La calprotectina fecale è un indicatore della presenza di neutrofili nelle feci e non è specifica della MII.

3. PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

LIAISON® Calprotectin è un dosaggio tipo sandwich che impiega 2 anticorpi monoclonali per l'acquisizione e la determinazione della calprotectina. La calprotectina viene in primo luogo estratta da campioni di feci con il tampone LIAISON® Q.S.E.T. Buffer (Quantitative Stool Extraction and Test) (REF 319135) utilizzando il procedimento di pesatura oppure il LIAISON® Q.S.E.T. Device (Quantitative Stool Extraction and Test) (REF 319050) o il LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus (Quantitative Stool Extraction and Test) (REF 319060). Il dosaggio procede all'incubazione del campione estratto, del calibratore o del controllo con un tampone di analisi e particelle paramagnetiche rivestite di un anticorpo monoclonale che riconosce specificamente l'eterocomplesso calprotectina. Dopo l'incubazione, viene eseguito un ciclo di lavaggio per rimuovere il materiale non legato. Successivamente un anticorpo monoclonale coniugato con isoluminolo che riconosce la calprotectina viene aggiunto alla reazione e incubato. Il coniugato non legato viene rimosso con un secondo ciclo di lavaggio. In seguito vengono aggiunti i reattivi starter che inducono una reazione di chemiluminescenza con andamento di tipo "flash". Il segnale luminoso è misurato da un fotomoltiplicatore in unità relative di luce (RLU) ed è proporzionale alla concentrazione di calprotectina presente nei calibratori, nei controlli o nei campioni.

* LIAISON®, LIAISON® XL e LIAISON® XS

4. MATERIALI FORNITI

Integrale di reagenti

Particelle magnetiche (2,4 ml)	SORB	Particelle magnetiche rivestite con anticorpo monoclonale di topo diretto contro la calprotectina in una soluzione tamponata contenente sieralbumina bovina (BSA), tensioattivo, 0,1% ProClin® 300 e 0,05% gentamicina solfato.
Coniugato (25,0 ml)	CONJ	Anticorpo monoclonale di topo diretto contro la calprotectina coniugato con un derivato dell'isoluminolo in una soluzione tamponata contenente sieralbumina bovina, tensioattivo, 0,1% ProClin® 300 e 0,05% gentamicina solfato.
Tampone di analisi (27,0 ml)	BUFAS	Soluzione tamponata contenente sieralbumina bovina, tensioattivo, 0,1% ProClin® 300 e 0,05% gentamicina solfato.
Diluente per campioni (13,0 ml)	DILSPE	Soluzione tamponata contenente sieralbumina bovina, tensioattivo, 0,1% ProClin® 300 e 0,05% gentamicina solfato.
Numero di test		100

ProClin è un marchio di Dow Chemical Company (Dow) o di una società affiliata di Dow.

Tutti i reattivi sono forniti pronti per l'uso. L'ordine dei reattivi rispecchia la disposizione dei contenitori nell'integrale di reattivi.

Ulteriori componenti non presenti nell'integrale di reattivi

Calibratore 1 2 x 1,0 ml Liofilizzato	CAL1	Antigene calprotectina ricombinante in una soluzione tamponata contenente sieralbumina bovina, tensioattivo, 0,1% ProClin® 300 e 0,05% gentamicina solfato. Ricostituire in 1 ml di acqua distillata o deionizzata.
Calibratore 2 2 x 1,0 ml Liofilizzato	CAL2	Antigene calprotectina ricombinante in una soluzione tamponata contenente sieralbumina bovina, tensioattivo, 0,1% ProClin® 300 e 0,05% gentamicina solfato. Ricostituire in 1 ml di acqua distillata o deionizzata.

Standardizzazione: Le concentrazioni dei calibratori sono tarate contro una preparazione standard realizzata internamente.

Materiali richiesti ma non forniti (correlati al sistema)

LIAISON® XL Analyzer	LIAISON® Analyzer	LIAISON® XS Analyzer
LIAISON® Wash/System Liquid (REF 319100)	LIAISON® Wash/System Liquid (REF 319100)	LIAISON® EASY Wash Buffer (REF 319301)
-	-	LIAISON® EASY System Liquid (REF 319302)
LIAISON® XL Waste Bags (REF X0025)	LIAISON® Waste Bags (REF 450003)	LIAISON® EASY Waste (REF X0054)
LIAISON® XL Cuvettes (REF X0016)	LIAISON® Module (REF 319130)	LIAISON® Cuvettes on Tray (REF X0053)
LIAISON® XL Starter Kit (REF 319200) o	LIAISON® Starter Kit (REF 319102) o	LIAISON® EASY Starter Kit (REF 319300)
LIAISON® EASY Starter Kit (REF 319300)	LIAISON® XL Starter Kit (REF 319200) o	LIAISON® Disposable Tips (REF X0055)
LIAISON® XL Disposable Tips (REF X0015) o	LIAISON® EASY Starter Kit (REF 319300)	LIAISON® EASY Cleaning Tool (REF 310996)
LIAISON® Disposable Tips (REF X0055)	LIAISON® Cleaning Kit (REF 310990)	-
-	LIAISON® Light Check 12 (REF 319150)	-

Altri materiali richiesti

LIAISON® Q.S.E.T. Buffer (REF 319135)
LIAISON® Calprotectin Control Set (REF 318961)

Forniture di laboratorio opzionali disponibili presso DiaSorin

LIAISON® Q.S.E.T. Device (REF 319050)
LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus (REF 319060)

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO* – Non per uso interno o esterno nell'uomo o negli animali.

Sicurezza generale:

- Tutti i campioni, i reagenti biologici e i materiali utilizzati nel dosaggio devono essere considerati potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. Durante l'esecuzione del test seguire le buone pratiche di igiene industriale.
- Non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nel laboratorio in cui viene eseguito il dosaggio.
- Non pipettare soluzioni con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con qualsiasi materiale potenzialmente infettivo indossando camice da laboratorio, protezioni per gli occhi/il viso e guanti monouso.
- Lavarsi accuratamente le mani al termine di ogni dosaggio.
- Evitare schizzi o la formazione di aerosol durante la manipolazione, la diluizione o il trasferimento di campioni o reagenti. Eventuali perdite di reattivo dovranno essere decontaminate con una soluzione di candeggina al 10% (contenente 0,5% di ipoclorito di sodio) e smaltite come potenzialmente infettive.
- I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni e linee guida vigenti degli organismi locali competenti e alle normative applicabili di ciascun Paese.
- Non usare kit o componenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

INFORMAZIONI SUI PERICOLI CHIMICI E SULLA SICUREZZA: I reattivi di questo kit sono classificati in base alla normativa statunitense OSHA Hazard Communication Standard, alle leggi sul diritto all'informazione dei singoli stati USA, alle regolamentazioni sul controllo dei prodotti del Canadian Centre for Occupational Health and Safety e alle direttive applicabili dell'Unione Europea (vedere la scheda di sicurezza dei materiali per ulteriori informazioni).

GHS/CLP:

ProClin®							
Numero CAS:	55965-84-9						
Reagenti:	<table border="1"><tr><td>SORB</td></tr><tr><td>CONJ</td></tr><tr><td>BUFIAS</td></tr><tr><td>DILSPE</td></tr><tr><td>CAL1</td></tr><tr><td>CAL2</td></tr></table>	SORB	CONJ	BUFIAS	DILSPE	CAL1	CAL2
SORB							
CONJ							
BUFIAS							
DILSPE							
CAL1							
CAL2							
Classificazione:	Sensibilizzazione cutanea, categoria di pericolo 1						
Avvertenza:	Attenzione						
Pittogramma:	 GHS07 – Punto esclamativo						
Indicazioni di pericolo:	H317 – Può provocare una reazione allergica cutanea.						
Consigli di prudenza:	P261 – Evitare di respirare la nebbia o gli aerosol. P272 – Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280 – Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi.						

6. PREPERAZIONE DELL'INTEGRALE DI REAGENTI

Osservare le seguenti precauzioni importanti per la manipolazione dei reagenti:

6.1 Risospensione delle particelle magnetiche

Le particelle magnetiche devono essere completamente risospese prima che l'integrale venga collocato sullo strumento. Per garantire una sospensione completa, procedere come segue:

- Prima di rimuovere la pellicola sigillante, girare la rotellina situata in corrispondenza del compartimento delle particelle magnetiche fino a quando il colore della sospensione non diventa marrone. Per favorire la sospensione delle particelle magnetiche è possibile mescolare delicatamente e con molta attenzione con un movimento orizzontale (evitare la formazione di schiuma). Controllare visivamente il fondo del flaconcino delle particelle magnetiche per assicurarsi che tutte le particelle magnetiche sedimentate siano state risospese.
- Se necessario, ripetere la procedura fino alla completa risospensione delle particelle magnetiche.
- Se necessario, dopo la rimozione della pellicola sigillante, pulire accuratamente la superficie di ogni setto per eliminare eventuale liquido residuo.

6.2 Formazione di schiuma nei reagenti

Al fine di garantire prestazioni ottimali dell'integrale, si raccomanda di evitare la formazione di schiuma nei reagenti. Osservare le raccomandazioni riportate di seguito per evitare che ciò si verifichi:

- Prima di utilizzare l'integrale, ispezionare visivamente i reagenti per assicurarsi che non sia presente schiuma. In caso di presenza di schiuma dopo la risospensione delle particelle magnetiche, collocare l'integrale sullo strumento e attendere che la schiuma si dissolva. L'integrale è pronto per l'uso una volta che la schiuma si è dissolta e dopo essere rimasto sullo strumento e in agitazione.

6.3 Caricamento dell'integrale nell'area reagenti

LIAISON[®] Analyzer

- Posizionare l'integrale nell'area reattivi dello strumento con l'etichetta dei codici a barre rivolta a sinistra e lasciare in agitazione per 30 minuti prima dell'uso. Le particelle magnetiche vengono mantenute automaticamente in agitazione dall'analizzatore per assicurare una risospensione completa.
- Fare riferimento al manuale operativo dell'analizzatore per caricare i campioni e iniziare la sessione analitica.

LIAISON[®] XL Analyzer e LIAISON[®] XS Analyzer

- LIAISON[®] XL Analyzer e LIAISON[®] XS Analyzer sono dotati di un dispositivo magnetico allo stato solido integrato che favorisce la dispersione delle microparticelle prima di posizionare un integrale di reattivi nell'area reagenti dello strumento. Consultare il manuale operativo dell'analizzatore per informazioni dettagliate.
 - a. Posizionare l'integrale di reattivi nella apposita sede di alloggiamento.
 - b. Lasciare riposare l'integrale di reattivi nel dispositivo magnetico per almeno 30 secondi (fino a diversi minuti). Ripetere l'operazione se necessario.
- Posizionare l'integrale di reattivi nell'area reattivi dello strumento con l'etichetta rivolta a sinistra e lasciare in agitazione per 15 minuti prima dell'uso. Le particelle magnetiche vengono mantenute automaticamente in agitazione dall'analizzatore per assicurare una risospensione completa.
- Fare riferimento al manuale operativo dell'analizzatore per caricare i campioni e iniziare la sessione analitica.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DELL'INTEGRALE DI REATTIVI

Alla consegna, l'integrale di reagenti deve essere conservato in posizione verticale per favorire la risospensione delle particelle magnetiche. Se l'integrale di reagenti viene conservato sigillato, i reagenti sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza. Non congelare. L'integrale di reagenti non deve essere utilizzato dopo la data di scadenza indicata sulle etichette del kit e dell'integrale stesso. Dopo la rimozione della pellicola sigillante, gli integrali di reattivi possono essere riposti nella scatola del kit e conservati in posizione verticale a una temperatura di 2-8°C oppure caricati nello strumento per 56 giorni.

8. PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni di feci in un contenitore pulito a tenuta d'aria senza conservante. I campioni devono essere conservati a 2-8°C e analizzati il prima possibile dopo la ricezione; tuttavia, è accettabile la conservazione a [temperatura ambiente per max. 6 ore](#) o a 2-8°C per max. 72 ore. Se i campioni non vengono analizzati entro 72 ore, devono essere conservati congelati a -20°C o a temperatura inferiore subito dopo la ricezione. [I campioni possono essere conservati congelati a -20°C per max. 16 settimane](#). Lasciare riscaldare i campioni di feci a temperatura ambiente e miscelarli il più accuratamente possibile prima dell'uso. I campioni di feci sono stabili per 3 cicli di congelamento e scongelamento.

9. CONSERVAZIONE DEGLI ESTRATTI DI CAMPIONI

9.1. Procedimento di pesatura

Gli estratti di campioni di feci trattati mediante il metodo di pesatura sono stabili per 8 ore a temperatura ambiente (18-25°C) o per 7 giorni a 2-8°C prima di essere esaminati. Gli estratti di campioni di feci non devono essere conservati congelati.

9.2 Procedura eseguita con il LIAISON[®] Q.S.E.T. Device Plus

Gli estratti di campioni di feci trattati mediante il LIAISON[®] Q.S.E.T. Device Plus sono stabili per max. 4 ore a temperatura ambiente (18-25°C), 6 ore a 2-8°C o 7 giorni congelati a -20°C prima di essere analizzati. Se congelati, gli estratti sono stabili per 1 ciclo di congelamento e scongelamento. Per tempi di conservazione più lunghi a 2-8°C gli estratti ottenuti dal dispositivo devono essere trattati come segue.

1. Trasferire 1,0 ml dell'estratto di feci in una provetta per microcentrifuga e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g*.
2. Trasferire 0,5 ml del supernatante trasparente in una nuova provetta per campioni per la conservazione e l'analisi.
3. Ora l'estratto può essere conservato a 2-8°C per max. 7 giorni.

$$*g = (1118 \times 10^{-8})(\text{raggio in cm})(\text{rpm})^2$$

9.3 Procedura eseguita con il LIAISON® Q.S.E.T. Device

Gli estratti di campione di feci trattati mediante il LIAISON® Q.S.E.T. Device sono stabili per 4 ore a temperatura ambiente (18-25°C) o per 6 ore a 2-8°C prima di essere esaminati. Per tempi di conservazione più lunghi a 2-8°C gli estratti ottenuti dal dispositivo devono essere trattati come segue.

1. Trasferire 1,0 ml dell'estratto di feci in una provetta per microcentrifuga e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g*.
2. Trasferire 0,5 ml del supernatante trasparente in una nuova provetta per campioni per la conservazione e l'analisi.
3. Ora l'estratto può essere conservato a 2-8°C per max. 7 giorni. Gli estratti di campioni di feci non devono essere conservati congelati.

10. CALIBRATORI 1 e 2

I calibratori LIAISON® Calprotectin sono forniti in forma liofilizzata. Ricostituire ogni flacone con 1,0 ml di acqua distillata o deionizzata. Lasciare riposare i flaconi per 5 minuti a temperatura ambiente, mescolare delicatamente mediante capovolgimento prima dell'uso. Trasferire almeno 350 µl (taratura in triplicato) in una provetta di vetro o plastica. Applicare alla provetta l'etichetta appropriata con il codice a barre, collocare la provetta nel portacampioni appropriato e caricarlo nell'analizzatore. Calibrare il dosaggio come descritto nel manuale operativo. In caso di mancata lettura dei codici a barre dei calibratori esterni, i dati presenti sulle etichette dei calibratori esterni (sotto al codice a barre) possono essere inseriti manualmente nello strumento. Tarare il test come descritto nel manuale operativo dello strumento.

I calibratori LIAISON® Calprotectin devono essere suddivisi in aliquote dopo la ricostituzione nel caso in cui non vengano immediatamente dosati. È stato dimostrato che i calibratori LIAISON® Calprotectin sono stabili per 6 ore se conservati a temperatura ambiente e per 28 giorni se conservati a 2-8°C.

LIAISON® Analyzer:

Trasferire la provetta al rack "A" del LIAISON® Analyzer con il codice a barre rivolto verso l'esterno e far scorrere il rack all'interno dell'area dei campioni del LIAISON® Analyzer.

LIAISON® XL e LIAISON® XS Analyzer:

Trasferire la provetta al rack "A" del LIAISON® XL o LIAISON® XS Analyzer con il codice a barre rivolto verso l'esterno e far scorrere il rack all'interno dell'area dei campioni del LIAISON® XL o LIAISON® XS Analyzer.

Il calibratore e il lotto dell'integrale di reattivi sono specifici per il lotto del kit. Non utilizzare calibratori associati a un diverso lotto di reattivi nello stesso test.

11. CALIBRAZIONE

I singoli integrali di reattivi LIAISON® Calprotectin Reagent Integrals contengono informazioni specifiche per la calibrazione di quel particolare lotto. L'analisi dei calibratori specifici per il test consente di rilevare i valori delle unità di luce relativa (RLU) per la regolazione della curva master assegnata. Ogni soluzione di taratura consente di eseguire 4 tarature.

È necessario ripetere la calibrazione in triplicato ogni volta che si verifica almeno 1 delle seguenti condizioni:

- Viene utilizzato un nuovo lotto di reagenti (integrale di reagenti o reagenti starter).
- Sono trascorsi più di 28 giorni dall'esecuzione della calibrazione precedente.
- I risultati del controllo di qualità non rientrano nell'intervallo accettabile.
- L'analizzatore ha subito un intervento di assistenza tecnica.

Consultare il manuale operativo dell'analizzatore per istruzioni sulla calibrazione.

Intervallo di misurazione: Il dosaggio LIAISON® Calprotectin esegue misurazioni comprese tra 5 e 800 µg/g.

Il valore minimo refertabile è 5 µg/g. Valori inferiori a 5 µg/g dovranno essere indicati come < 5 µg/g. Il valore massimo refertabile senza diluizione è 800 µg/g.

Campioni con concentrazioni superiori all'intervallo di dosaggio definito per l'analisi possono essere diluiti sull'analizzatore con il diluente dei campioni fornito e rianalizzati. La diluizione consigliata per campioni che superano l'intervallo di misurazione del test è 1:10 (ad esempio 15 µl di campione + 135 µl di diluente dei campioni).

12. ESTRAZIONE DEI CAMPIONI

I metodi che seguono sono utilizzati per estrarre campioni di feci prima dell'analisi con il dosaggio LIAISON® Calprotectin. Ogni laboratorio deve determinare il proprio metodo di elezione.

METODO 1: Protocollo di pesatura

Materiali richiesti ma non forniti:

Provette in polipropilene con tappo a vite da 15 ml
Provette per microcentrifuga da 1,0 - 2,0 ml
Anello di inoculazione con manico rompibile da 10 µl
Bilancia analitica (50-100 mg)
Agitatore vortex multiprovetta
Microcentrifuga (3.000 x g)
Pipette regolabili da 100 e 1000 µl con puntali monouso

Procedimento:

1. Pesare (tara) una provetta con tappo a vite etichettata vuota insieme all'anello di inoculazione.
2. Utilizzando un anello di inoculazione, rimuovere 50-100 mg di feci e inserirle nella provetta precedentemente pesata.
3. Pesare la provetta e l'anello con le feci.
4. Calcolare il peso netto delle feci.
5. Rompere il manico dell'anello di inoculazione, lasciando all'interno della provetta l'anello e 4-6 cm di manico.
6. Aggiungere 1X LIAISON® Q.S.E.T. Buffer (49 volte il volume del peso delle feci) nella provetta. Utilizzare la tabella che segue. Avvitare strettamente il tappo sulla provetta.

Peso netto delle feci (mg)	Volume di 1X LIAISON® Q,S,E,T, Buffer (ml)
50	2,5
55	2,7
60	2,9
65	3,2
70	3,4
75	3,7
80	3,9
85	4,2
90	4,4
95	4,7
100	4,9

7. Omogeneizzare il campione in un agitatore vortex multiprovetta alla regolazione massima per 30 minuti.
8. Trasferire 1,0 ml dell'omogenato in una provetta per microcentrifuga e centrifugare in una microcentrifuga per 5 minuti a 3.000 x g*.
9. Miscelare 100 µl del surnatante estratto limpido con 850 µl 1X LIAISON® Q.S.E.T. Buffer in una nuova provetta per campioni.
10. Posizionare il campione nel rack portacampioni "A" del LIAISON®, LIAISON® XL o LIAISON® XS e far scorrere il rack all'interno del DiaSorin LIAISON® Analyzer per l'analisi.
11. Pulire l'area di lavoro con una soluzione di candeggina al 10% (ipoclorito di sodio allo 0,5%).

Per l'esecuzione del test il volume finale dell'estratto del campione deve essere di 250 µl.

METODO 2: LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus

NOTA: I campioni di feci molto solide non devono essere estratti con LIAISON® Q.S.E.T. Device. I campioni di feci liquide possono essere pipettati direttamente nel LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus. Vedere la procedura alternativa più avanti. I campioni di feci non adatti all'uso con LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus devono utilizzare il metodo della pesatura delle feci.

Materiali richiesti ma non forniti:

LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus (REF 319060)
Agitatore vortex multiprovetta (potenza dichiarata dal fabbricante 2500 rpm)

Procedimento:

1. Svitare l'asticella di raccolta (tappo blu).
2. Immergere l'asticella di raccolta nel campione di feci più volte (3 – 5 punti), fino a quando le scanalature sono completamente coperte.
3. Reinserire l'asticella di raccolta nel dispositivo e avvitare strettamente. Il materiale fecale in eccesso verrà rimosso dall'asticella mediante l'imbuto di gomma. **NOTA:** a questo punto il dispositivo può essere conservato a temperatura ambiente per 8 ore o per 7 giorni a 2-8°C prima di passare al successivo punto 4.
4. Tenendo il tappo rivolto verso l'alto, omogeneizzare le feci in un agitatore vortex multiprovetta alla regolazione massima per 30 minuti.
5. Verificare che non rimangano tracce visibili di materiale fecale nelle scanalature dell'asticella di raccolta. Se necessario, continuare ad agitare fino a quando nelle scanalature non rimane più materiale fecale.
6. Svitare il tappo trasparente e smaltirlo nell'apposito contenitore per rifiuti biologici pericolosi.
7. Rimuovere con una pipetta l'eventuale schiuma o le bolle presenti dopo l'agitazione nel Vortex prima di procedere all'inserimento nello strumento.
8. Posizionare il dispositivo di estrazione nel rack portacampioni appropriato e farlo scorrere all'interno del LIAISON[®] Analyzer per l'analisi.
9. Pulire l'area di lavoro con una soluzione di candeggina al 10% (ipoclorito di sodio allo 0,5%).
10. Al termine dell'analisi, tappare il Q.S.E.T. Device Plus con un tappo secondario adatto per la conservazione o lo smaltimento dell'estratto.

Procedura di campionamento per feci liquide:

Svitare il tappo trasparente e pipettare 12 µl di campione di feci liquide nel LIAISON[®] Q.S.E.T. Device Plus.

ATTENZIONE: le feci liquide contengono spesso delle particelle solide che possono otturare la pipetta durante questo processo. Accertarsi con cura che venga aspirato il volume corretto.

Riposizionare il tappo trasparente sul dispositivo e serrare saldamente.

Procedere con le fasi 4-10 come indicato sopra.

In fondo alle presenti Istruzioni per l'uso sono riportati dei disegni che illustrano le procedure di estrazione delle feci con il metodo di pesatura e con LIAISON[®] Q.S.E.T. Device Plus.

METODO 3: LIAISON[®] Q.S.E.T. Device

NOTA: I campioni di feci molto solide non devono essere estratti con LIAISON[®] Q.S.E.T. Device. I campioni di feci liquide possono essere pipettati direttamente nel LIAISON[®] Q.S.E.T. Device. Vedere la procedura alternativa più avanti. I campioni di feci non adatti all'uso con LIAISON[®] Q.S.E.T. Device devono utilizzare il metodo della pesatura delle feci.

Materiali richiesti ma non forniti:

LIAISON[®] Q.S.E.T. Device ([REF] 319050)

LIAISON[®] Q.S.E.T. Buffer ([REF] 319135)

Agitatore vortex multiprovetta

Procedimento:

1. Assicurarsi che il tappo blu sia saldamente serrato.
2. Rimuovere il tappo trasparente e riempire il dispositivo con 6,0 ml di tampone 1x LIAISON[®] Q.S.E.T. Buffer.
3. Riposizionare il tappo trasparente sul dispositivo e serrare saldamente.
4. Capovolgere il dispositivo in modo che il tappo blu sia rivolto verso l'alto.
5. Svitare l'asticella di raccolta (tappo blu).
6. Immergere l'asticella di raccolta nel campione di feci più volte (3 – 5 punti), fino a quando le scanalature sono completamente coperte.
7. Reinserire l'asticella di raccolta nel dispositivo e avvitare strettamente. Il materiale fecale in eccesso verrà rimosso dall'asticella mediante l'imbuto di gomma.
8. Tenendo il tappo blu rivolto verso l'alto, omogeneizzare le feci in un agitatore vortex multiprovetta alla regolazione massima per 30 minuti.
9. Verificare che non rimangano tracce visibili di materiale fecale nelle scanalature dell'asticella di raccolta. Se necessario, continuare ad agitare fino a quando nelle scanalature non rimane più materiale fecale.
10. Capovolgere il dispositivo in modo che il tappo trasparente sia rivolto verso l'alto.
11. Svitare il tappo trasparente e smaltirlo nell'apposito contenitore per rifiuti biologici pericolosi.
12. Rimuovere con una pipetta l'eventuale schiuma o le bolle presenti dopo l'agitazione nel Vortex prima di procedere all'inserimento nello strumento.
13. Collocare il dispositivo di estrazione nell'apposito rack portacampioni del LIAISON[®], LIAISON[®] XL o LIAISON[®] XS e far scorrere il rack all'interno del DiaSorin LIAISON[®] Analyzer per l'analisi.
14. Pulire l'area di lavoro con una soluzione di candeggina al 10% (ipoclorito di sodio allo 0,5%).

Procedura di campionamento per feci liquide:

Seguire le fasi 1-2 come indicato nella procedura sopra usando LIAISON® Q.S.E.T. Device.

Pipettare 12 µl di campione di feci liquide nel dispositivo di estrazione contenente tampone.

ATTENZIONE: le feci liquide contengono spesso delle particelle solide che possono otturare la pipetta durante questo processo. Accertarsi con cura che venga aspirato il volume corretto. Riposizionare il tappo trasparente sul dispositivo e serrare saldamente.

Procedere con le fasi 8-14 come indicato sopra.

I diagrammi che illustrano la procedura di estrazione delle feci utilizzando il metodo di pesatura e il DiaSorin LIAISON® Q.S.E.T. Device sono riportati in fondo alle istruzioni per l'uso.

13. PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Per ottenere prestazioni analitiche ottimali, attenersi scrupolosamente alle istruzioni per l'uso dello strumento.

LIAISON® Analyzer: Tutti i parametri del test sono identificati attraverso i codici a barre riportati sull'etichetta dell'integrale di reattivi. Nel caso in cui l'etichetta del codice a barre non possa essere letta dallo strumento, l'integrale non può essere usato. Non smaltire l'integrale di reattivi; per istruzioni sullo smaltimento, contattare il servizio locale di assistenza tecnica DiaSorin.

LIAISON® XL e LIAISON® XS Analyzer: Tutti i parametri del test sono identificati attraverso le informazioni codificate nel tag per identificazione a radiofrequenza (Radio Frequency Identification transponder, RFID Tag) nell'integrale di reattivi. Nel caso in cui il tag RFID non possa essere letto dall'analizzatore, l'integrale non può essere utilizzato. Non smaltire l'integrale di reattivi; per istruzioni sullo smaltimento, contattare il servizio locale di assistenza tecnica DiaSorin.

Fare riferimento al manuale operativo dello strumento per informazioni più dettagliate.

Le operazioni da eseguire con lo strumento sono le seguenti:

LIAISON® Analyzer:

1. Dispensare i calibratori, i controlli o i campioni
2. Dispensare le particelle magnetiche rivestite
3. Dispensare il tampone per analisi
4. Incubare
5. Lavare con la soluzione di lavaggio/sistema
6. Dispensare il coniugato
7. Incubare
8. Lavare con la soluzione di lavaggio/sistema
9. Aggiungere i reagenti starter e misurare la luce emessa

LIAISON® XL e LIAISON® XS Analyzer:

1. Dispensare le particelle magnetiche rivestite
2. Dispensare il tampone per analisi
3. Dispensare i calibratori, i controlli o i campioni
4. Incubare
5. Lavare con la soluzione di lavaggio/sistema
6. Dispensare il coniugato
7. Incubare
8. Lavare con la soluzione di lavaggio/sistema.
9. Aggiungere i reagenti starter e misurare la luce emessa

14. CONTROLLO DI QUALITÀ

Il controllo di qualità deve essere eseguito una volta al giorno per ogni giorno di utilizzo oppure in base alle linee guida o alle disposizioni delle normative locali o degli organismi accreditati. Si raccomanda all'utente di consultare la documentazione CLSI C24-A3⁽¹⁰⁾ e 42 CFR 493.1256 (c) per le direttive sulle pratiche idonee di controllo della qualità.

Il LIAISON® Calprotectin Control Set è destinato all'uso come controllo di un eventuale malfunzionamento sostanziale dei reattivi. I controlli LIAISON® devono essere analizzati in singolo per valutare le prestazioni del test. Se i valori dei controlli sono compresi nei limiti attesi indicati nel certificato di analisi, il test è valido. Se i valori dei controlli non rientrano negli intervalli attesi, il test non è valido e i risultati del paziente non possono essere refertati. In caso di anomalia in un controllo, è necessario eseguire la calibrazione del dosaggio e ripetere l'analisi dei controlli e dei campioni dei pazienti.

Prima di utilizzare altri controlli, occorre valutarne le prestazioni per verificare che siano compatibili con questo dosaggio. È necessario stabilire intervalli di valori appropriati per tutti i materiali utilizzati per il controllo di qualità.

L'intervallo delle concentrazioni di ciascun controllo è riportato sul certificato di analisi e indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori dei controlli che possono essere ottenuti in dosaggi affidabili.

15. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Lo strumento LIAISON® Analyzer calcola automaticamente la concentrazione di calprotectina nel campione. Questa concentrazione è espressa in µg/g.

I punti di decisione medici per il dosaggio LIAISON® Calprotectin sono stati determinati dai risultati ottenuti da popolazioni di pazienti apparentemente sani e soggetti con diagnosi medica di MII, SII o di altri disturbi gastrointestinali. I risultati dei pazienti devono essere interpretati come segue:

Concentrazione di calprotectina	Risultati
< 50 µg/g	Normale
50 - 120 µg/g	Borderline
> 120 µg/g	Elevati

Si raccomanda di rivalutare i livelli borderline di calprotectina fecale dopo 4-6 settimane per determinare lo stato infiammatorio. Questa decisione deve essere presa dal medico valutando congiuntamente i sintomi clinici del paziente, la sua anamnesi ed altri risultati clinici e di laboratorio.

Avvertenza – Se il risultato del campione visualizza “RLU invalido” e un punto esclamativo (!), il risultato ottenuto è inferiore all’intervallo del segnale di dosaggio. Il campione deve essere rianalizzato. Se dopo la ripetizione del test il risultato del campione viene visualizzato ancora come “invalid RLU” (valore RLU non valido), contattare l’assistenza tecnica DiaSorin.

16. LIMITI DELLA PROCEDURA

1. I risultati devono essere valutati insieme ad altri riscontri clinici e di laboratorio, come ausilio per il medico nella decisione terapeutica per il singolo paziente.
2. Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere una adeguata manualità tecnica.
3. Non utilizzare il LIAISON® Q.S.E.T. Device o il LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus per trattare feci molto solide.
4. I pazienti che assumono FANS possono presentare innalzamenti dei livelli di calprotectina fecale^(8,9).
5. Poiché la calprotectina è presente nel citoplasma dei neutrofili, è possibile che l'analisi di campioni di feci ematiche dia valori di calprotectina elevati.
6. Si potrebbero ottenere risultati falsi negativi in pazienti affetti da granulocitopenia dovuta a depressione del midollo osseo.
7. I pazienti affetti da MII passano da fasi attive (infiammatorie) a inattive della malattia e viceversa. Nell'interpretazione dei risultati, occorre tenere conto di tali fasi.
8. I risultati possono non essere clinicamente applicabili ai bambini di età inferiore ai 2 anni con livelli di calprotectina fecale leggermente aumentati.
9. Altre patologie intestinali, incluse numerose infezioni gastrointestinali e il cancro coloretale, possono risultare in elevati livelli di calprotectina. Pertanto la formulazione di una diagnosi di MII attiva dovrebbe avvenire solo nel quadro di altri esami diagnostici e considerando lo stato clinico complessivo del paziente.
10. La calprotectina fecale è un indicatore della presenza di neutrofili nelle feci e non è specifica della MII.

Non è possibile scambiare gli integrali fra i diversi strumenti (LIAISON®, LIAISON® XL e LIAISON® XS). Se un integrale è stato utilizzato con un tipo di strumento, deve essere usato sempre con lo stesso strumento fino a che viene esaurito. Per le esigenze di tracciabilità che derivano da questa procedura, il follow-up dei pazienti deve essere eseguito con lo stesso tipo di strumento. Queste procedure devono essere eseguite su 1 tipo di analizzatore specifico (LIAISON®, LIAISON® XL o LIAISON® XS).

17. VALORI ATTESI

Campioni di feci ottenuti da donatori apparentemente sani (15 soggetti di età compresa tra 3-21 anni e 112 adulti) e soggetti con diagnosi medica di SII e MII (19 soggetti di età compresa tra 8-21 anni e 333 adulti) sono stati analizzati con il dosaggio LIAISON® Calprotectin. I risultati sono stati valutati utilizzando i punti di decisione medici di 50 µg/g e 120 µg/g che corrispondono alla soglia generalmente accettata per discriminare tra MII e SII.

Diagnosi	Numero di soggetti e percentuale nell'intervallo (µg/g) di LIAISON® Calprotectin			
	< 50,0 Normale	50,0-120 Borderline	> 120 Elevati	Totale
Apparentemente sani	112 (88,2%)	15 (11,8%)	0 (0%)	127 (100%)
MII	2 (2,0%)	10 (9,8%)	90 (88,2%)	102 (100%)
SII	44 (65,7%)	15 (22,4%)	8 (11,9%)	67 (100%)
Altri disturbi GI	51 (71,8%)	15 (21,1%)	5 (7,1%)	71 (100%)

I risultati del test devono essere utilizzati in combinazione alle informazioni ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

18. PRESTAZIONI METODOLOGICHE SPECIFICHE

18.1 Comparazione dei metodi:

Un totale di 164 campioni di feci rientranti nell'intervallo di dosaggio sono stati analizzati con il dosaggio LIAISON® Calprotectin e un dosaggio commerciale per calprotectina in conformità al documento CLSI EP09-A3. I risultati sono stati analizzati con il metodo di Passing e Bablok e hanno riportato una pendenza di 0,97 (IC 95%: da 0,91 a 1,00), un'intercetta di 1,50 µg/g (IC 95%: da -2,26 a 6,46) e un valore R mediante regressione lineare di 0,961

È stata inoltre effettuata un'analisi della concordanza relativamente ai valori di cut-off del test per i punti di decisione medici pertinenti. Le concordanze positive e negative sono state calcolate con risultati borderline considerati come normali e come elevati/anomali. I risultati sono riassunti nelle tabelle sottostanti.

LIAISON® Calprotectin Assay Concentrazione	Dosaggio per calprotectina comparativo Concentrazione			
	< 50 µg/g (Normali)	50 – 120 µg/g (Borderline)	> 120 µg/g (Anomali)	Totale
< 50 µg/g (Normali)	32	4	0	36
50 - 120 µg/g (Borderline)	4	28	2	34
> 120 µg/g (Elevati)	0	4	90	94
Totale	36	36	92	164

Borderline considerati Elevati (Anomali)		Intervallo di confidenza 95%	
Concordanza positiva	(124/128)	96,9%	(92,2% - 99,1%)
Concordanza negativa	(32/36)	88,9%	(73,9% - 96,9%)
Borderline considerati Normali		Intervallo di confidenza 95%	
Concordanza positiva	(90/92)	97,8%	(92,4% - 99,7%)
Concordanza negativa	(68/72)	94,4%	(86,3% - 98,5%)

18.2 Concordanza clinica

Sono state determinate la specificità e la sensibilità cliniche del dosaggio LIAISON® Calprotectin rispetto alla diagnosi clinica analizzando un totale di 240 campioni di feci umane raccolti prospetticamente da soggetti con segni e sintomi indicativi di MII e SII. La diagnosi di MII, SII o altri disturbi GI è stata determinata sulla base dei risultati della colonscopia unitamente ad altri risultati clinici. La diagnosi di MII è stata confermata mediante valutazione istologica della biopsia. Le diagnosi finali dei soggetti sono state le seguenti: 102 MII (85 adulti 17 sogg. pediatrici), 67 SII (65 adulti e 2 sogg. pediatrici) e 71 disturbi gastrointestinali diversi da MII o SII.

Confronto tra MII e non MII:

La sensibilità e la specificità sono state calcolate per il dosaggio LIAISON® Calprotectin come ausilio per la diagnosi di MII in tutti i soggetti. I risultati borderline sono stati calcolati sia come valori normali che come valori elevati e sono stati riportati gli intervalli di confidenza del 95%.

	Calprotectina (µg/g)	II	Non II
Normale	< 50	2	95
Borderline	50-120	10	30
Elevati	> 120	90	13
Tutti		102	138

Borderline considerati Elevati		Intervallo di confidenza 95%	
Sensibilità clinica	100/102	98,0%	93,1 – 99,8%
Specificità clinica	95/138	66,8%	60,4 – 76,7%
Borderline considerati Normali		Intervallo di confidenza 95%	
Sensibilità clinica	90/102	88,2%	80,4 – 93,8%
Specificità clinica	125/138	90,6%	84,4 – 94,9%

Confronto tra MII e SII:

La sensibilità e la specificità sono state calcolate per il dosaggio LIAISON® Calprotectin come ausilio per la differenziazione tra MII e SII. I risultati borderline sono stati calcolati sia come valori normali che come valori elevati e sono stati riportati gli intervalli di confidenza del 95%.

	Calprotectina (µg/g)	MI I	SII
Normale	< 50	2	44
Borderline	50-120	10	15
Elevati	> 120	90	8
Tutti		102	67

Borderline come Elevati		Intervallo di confidenza 95%	
Sensibilità clinica	100/102	98,0%	93,1 – 99,8%
Specificità clinica	44/67	65,7%	53,1 – 76,9%

Borderline come Normali		Intervallo di confidenza 95%	
Sensibilità clinica	90/102	88,2%	80,4 – 93,8%
Specificità clinica	59/67	88,1%	77,8 – 94,7%

18.3 Precisione di LIAISON® Analyzer:

2 controlli del kit e 6 campioni contenenti concentrazioni di analita preparate in modo da coprire l'intero range del test sono stati esaminati in duplicato, due volte al giorno, per 20 giorni lavorativi su 1 strumento LIAISON® Analyzer utilizzando 1 lotto di reattivi per stabilire la ripetibilità e la riproducibilità del dosaggio LIAISON® Calprotectin. Il test è stato eseguito in osservanza alle disposizioni del documento CLSI EP5-A2⁽¹¹⁾.

Ripetibilità

Campione	KC 1	KC 2	1	2	3	4	5	6
Numero di determinazioni	80	80	80	80	80	80	80	80
Media (µg/g)	49,0	198	381	263	647	126	56,3	27,6
Deviazione standard (µg/g)	2,1	10,1	21,0	11,2	32,5	5,2	2,6	1,9
Coefficiente di variazione (%CV)	4,2	5,1	5,5	4,3	5,0	4,1	4,7	7,0

Riproducibilità

Campione	KC 1	KC 2	1	2	3	4	5	6
Numero di determinazioni	80	80	80	80	80	80	80	80
Media (µg/g)	49,0	198	381	263	647	126	56,3	27,6
Deviazione standard (µg/g)	2,5	11,9	22,3	15,1	33,5	6,0	2,9	2,1
Coefficiente di variazione (%CV)	5,1	6,0	5,9	5,8	5,2	4,8	5,2	7,6

Precisione di LIAISON® XL Analyzer:

Uno studio della durata di 12 giorni è stato condotto presso DiaSorin Inc. Un pannello di 6 campioni di feci umane contenenti concentrazioni di analita preparate per coprire l'intervallo di misurazione del dosaggio è stato estratto da ciascuno dei 3 operatori utilizzando il metodo di estrazione manuale ogni giorno per ciascuno dei 12 giorni lavorativi e analizzato in 2 replicati in 2 sessioni per giorno utilizzando 1 lotto di reattivi LIAISON® Calprotectin. Per la preparazione del protocollo del dosaggio è stato consultato il documento CLSI EP05-A3.

ID campione	Campione n	Media µg/g	Intra-analisi		Inter-analisi		Tra i giorni		Tra gli operatori		Totale	
			DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
Campione n. 1	144	24,9	0,74	3,0%	0,66	2,6%	2,91	11,7%	1,04	4,2%	3,25	13,0%
Campione n. 2	144	39,9	0,88	2,2%	0,76	1,9%	3,44	8,6%	0,00	0,0%	3,63	9,1%
Campione n. 3	144	155	3,99	2,6%	3,47	2,2%	11,26	7,2%	8,27	5,3%	14,94	9,6%
Campione n. 4	144	253	6,97	2,8%	8,18	3,2%	20,17	8,0%	2,87	1,1%	23,03	9,1%
Campione n. 5	144	21,6	0,67	3,1%	0,37	1,7%	2,93	13,5%	0,62	2,9%	3,09	14,3%
Campione n. 6	144	639	15,86	2,5%	25,31	4,0%	39,21	6,1%	21,03	3,3%	53,59	8,4%

Uno studio della durata di 5 giorni è stato condotto presso 2 laboratori esterni e presso DiaSorin Inc. Un pannello di 6 campioni di feci umane contenenti concentrazioni di analita preparate per coprire l'intervallo di misurazione del dosaggio è stato estratto ogni giorno presso ciascun sito utilizzando il metodo di estrazione manuale. Nello studio sono stati inclusi anche i controlli del kit. Ogni sito ha utilizzato almeno 2 operatori per eseguire l'estrazione e il dosaggio. I campioni sono stati testati in 6 replicati in 1 sessione ogni giorno usando 1 lotto di reattivi LIAISON® Calprotectin. Per la preparazione del protocollo del dosaggio è stato consultato il documento CLSI EP15-A3.

ID campione	Media µg/g	Intra-analisi		Tra i giorni		Intra-sito		Tra i siti		Totale	
		DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
Controllo 1	51,2	1,19	2,3%	3,67	7,2%	3,83	7,5%	0,15	0,3%	3,83	7,5%
Controllo 2	254	7,59	3,0%	26,11	10,3%	27,02	10,6%	0,00	0,0%	25,94	10,2%
Campione n. 1	25,9	0,68	2,6%	2,16	8,3%	2,25	8,7%	0,00	0,0%	2,17	8,4%
Campione n. 2	42,1	0,78	1,8%	5,26	12,5%	5,31	12,6%	1,87	4,4%	5,63	13,4%
Campione n. 3	173	4,65	2,7%	20,47	11,9%	20,91	12,1%	20,55	11,9%	29,32	17,0%
Campione n. 4	281	5,62	2,0%	26,92	9,6%	27,41	9,7%	40,10	14,3%	48,57	17,3%
Campione n. 5	23,4	0,60	2,6%	2,62	11,2%	2,68	11,5%	0,000	0,0%	2,45	10,5%
Campione n. 6	695	18,85	2,7%	66,06	9,5%	68,26	9,8%	39,61	5,7%	78,92	11,3%

Precisione di LIAISON® XS Analyzer:

Uno studio della durata di 5 giorni è stato condotto presso DiaSorin Inc. Un pannello di 6 campioni di feci umane contenenti concentrazioni di analita preparate per coprire l'intervallo di misurazione del dosaggio è stato estratto ogni giorno. Nello studio sono stati inclusi anche i controlli del kit. I campioni sono stati testati in 6 replicati in 1 sessione ogni giorno usando 1 lotto di reattivi LIAISON® Calprotectin. Per la preparazione del protocollo del dosaggio è stato consultato il documento CLSI EP15-A3.

ID campione	Media (µg/g)	Intra-analisi		Totale	
		DS	%CV	DS	%CV
Controllo 1	54,7	1,21	2,2%	2,65	4,8%
Controllo 2	262	14,4	5,5%	19,8	7,6%
Campione n. 1	24,1	0,76	3,2%	1,96	8,1%
Campione n. 2	39,2	0,75	1,9%	3,20	8,2%
Campione n. 3	164	5,7	3,5%	12,9	7,9%
Campione n. 4	275	11,5	4,2%	24,5	8,9%
Campione n. 5	19,7	0,50	2,6%	1,98	10,0%
Campione n. 6	693	37,5	5,4%	52,4	7,6%

RIPRODUCIBILITÀ DELL'ESTRAZIONE CON LIAISON® Q.S.E.T. DEVICE

La riproducibilità dell'estrazione con LIAISON® Q.S.E.T. Device è stata testata utilizzando 8 campioni di feci rientranti nell'intervallo di misurazione analitica del dosaggio. I campioni sono stati estratti usando il device Q.S.E.T. e testati 1 volta al giorno utilizzando 5 replicati per 5 giorni da 3 operatori, per un totale di 75 misurazioni per campione. Ciascuna estrazione con il device Q.S.E.T è stata effettuata giornalmente da ciascun operatore in modo indipendente. Per la preparazione del protocollo di prova è stato consultato il documento CLSI EP05-A3.

ID campione	N	media µg/g	Ripetibilità		Tra i giorni		Intra-operatore		Inter-operatore		Totale	
			DS (µg/g)	%CV	DS (µg/g)	%CV	DS (µg/g)	%CV	DS (µg/g)	%CV	DS (µg/g)	%CV
1	75	21,9	0,636	2,9%	3,179	14,5%	3,232	14,8%	0,945	4,3%	3,052	13,9%
2	75	26,2	0,807	3,1%	1,951	7,4%	2,085	7,9%	1,843	7,0%	2,643	10,1%
3	75	38,6	1,428	3,7%	4,727	12,2%	4,903	12,7%	1,335	3,5%	4,621	12,0%
4	75	166	6,137	3,7%	9,110	5,5%	10,69	6,5%	8,141	4,9%	12,81	7,7%
5	75	297	11,29	3,8%	28,62	9,6%	30,42	10,2%	6,594	2,2%	28,37	9,6%
6	75	505	18,59	3,7%	59,39	11,8%	61,77	12,2%	34,35	6,8%	65,49	13,0%
7	75	2381	62,56	2,6%	410,4	17,2%	414,4	17,4%	254,7	10,7%	450,5	18,9%
8	75	4140	126,8	3,1%	309,2	7,5%	330,1	8,0%	228,9	5,5%	377,1	9,1%

18.4 LoB – Limite del bianco (LoB)*

Seguendo il metodo CLSI EP17-A2⁽¹²⁾, il limite del bianco del dosaggio LIAISON® Calprotectin è 0,107 µg/g.

*Il limite del bianco, o il valore più alto che è probabile che venga osservato con un campione privo di analita, sostituisce il termine "sensibilità analitica".

18.5 LoD – Limite di rilevabilità (LoD)

Seguendo il metodo CLSI EP17-A2⁽¹²⁾, il limite di rilevabilità del dosaggio LIAISON® Calprotectin è 0,395 µg/g.

18.6 LoQ – Limite di quantificazione (LoQ)

Seguendo il metodo CLSI EP17-A2⁽¹²⁾, il limite di quantificazione del dosaggio LIAISON® Calprotectin è <5,0 µg/g.

18.7 Studio di linearità

1 estratto di campione di feci ad alta concentrazione contenente calprotectina al di sopra del range di misurazione del dosaggio a 800 µg/g è stato diluito e analizzato mediante il dosaggio LIAISON® Calprotectin seguendo il metodo CLSI EP6-A⁽¹³⁾. I risultati sono stati analizzati in termini di regressione della concentrazione osservata rispetto alla concentrazione prevista.

L'equazione risultante:

Calprotectina osservata = 0,96x + 4,14; R² = 1,00

18.8 Recupero

5 estratti di campioni di feci ad alta concentrazione e 5 estratti di campioni di feci a bassa concentrazione sono stati analizzati non diluiti. Successivamente sono stati preparati i campioni di recupero miscelando percentuali definite dei campioni ad alta e a bassa concentrazione e testati in 5 replicati. La media dei 5 replicati è fornita nella tabella seguente.

	Concentrazione attesa (µg/g)	Concentrazione osservata (µg/g)	% di recupero
Campione 1			
Alto (H) non diluito	-	747	-
2 H:1 L	516	526	102%
1 H:1 L	397	413	104%
1 H:2 L	278	301	108%
Basso (L) non diluito	-	47,3	-
Campione 2			
Alto (H) non diluito	-	674	-
2 H:1 L	466	454	98%
1 H:1 L	359	370	103%
1 H:2 L	252	256	102%
Basso (L) non diluito	-	43,6	-
Campione 3			
Alto (H) non diluito	-	611	-
2 H:1 L	422	417	99%
1 H:1 L	325	331	102%
1 H:2 L	227	234	103%
Basso (L) non diluito	-	37,7	-
Campione 4			
Alto (H) non diluito	-	672	-
2 H:1 L	459	454	99%
1 H:1 L	349	370	106%
1 H:2 L	239	245	103%
Basso (L) non diluito	-	26,1	-
Campione 5			
Alto (H) non diluito	-	339	-
2 H:1 L	232	225	97%
1 H:1 L	177	162	91%
1 H:2 L	122	116	94%
Basso (L) non diluito	-	15,9	-
		Recupero medio	101% (91%-108%)

18.9 Sostanze interferenti

Studi controllati di sostanze e microrganismi potenzialmente interferenti condotti su un estratto di campione di feci con un livello di calprotectina di circa 50 µg/g non hanno mostrato alcuna interferenza nel dosaggio LIAISON® Calprotectin alla concentrazione massima per ciascuna delle sostanze o dei microrganismi elencati di seguito. Il test era basato sul documento CLSI-EP7-A2⁽¹⁴⁾.

Farmaco/Sostanza	Concentrazione analizzata
Acido stearico	2,65 mg/ml
Acido palmitico	1,3 mg/ml
Emoglobina	6,7 µg/ml
Proteina S100A12	21,0 µg/ml
Solfato di bario	5,0 mg/ml
Imodium AD®	6,67 µg/ml
Kaopectate®	0,87 mg/ml
Metronidazolo	12,5 mg/ml
Mucina	3,33 mg/ml
Mylanta®	4,2 mg/ml
Pepto Bismol®	0,87 mg/ml
Polietilenglicole 3350	79,05 mg/ml
Prilosec®	0,5 mg/ml
Simeticone	0,625 mg/ml
Tagamet®	0,5 mg/ml
Tums®	0,5 mg/ml
Vancomicina cloridrato	2,5 mg/ml
Mesalamina	5,0 mg/ml
Prednisone	0,3 mg/ml
Lansoprazolo	0,2 mg/ml
Sulfametossazolo	1,6 mg/ml
Ciprofloxacina	1,25 mg/ml
Vitamina E	0,3 mg/ml
Vitamina D ₃	0,1 µg/ml
Provitamina A	5 mg/ml
Azatioprina	0,2 mg/ml
Vitamina C	0,1 mg/ml

Microrganismo	Concentrazione finale della variante nel campione
<i>Citrobacter freundii</i>	1,2 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,2 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1,2 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Salmonella enterica</i>	1,2 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Shigella boydii</i>	1,2 x 10 ⁸ UFC/ml
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,2 x 10 ⁸ UFC/ml

18.10 Contaminazione carry-over

Il test è stato eseguito per determinare l'eventuale presenza di contaminazione carry-over dallo strumento. I risultati ottenuti non hanno mostrato alcuna variazione del valore atteso, quindi i risultati dimostrano che non è stata osservata alcuna contaminazione carry-over con i campioni di feci nel dosaggio LIAISON® Calprotectin eseguito sullo strumento LIAISON® Analyzer. Non può esservi contaminazione carry-over non con lo strumento LIAISON® XL Analyzer in quanto per pipettare i campioni sono utilizzate punte monouso.

18.11 Effetto gancio ad alto dosaggio

Non è stato osservato nessun effetto gancio a dosi elevate con concentrazioni di calprotectina fino a 100.000 µg/g.

18.12 ACCURATEZZA DI LIAISON® Q.S.E.T. DEVICE

Sono stati estratti 128 campioni di feci umane rientranti nell'intervallo di misurazione del dosaggio LIAISON® Calprotectin utilizzando il LIAISON® Q.S.E.T. Device e il metodo di pesatura per determinare se questi metodi di estrazione forniscano risultati equivalenti. Ogni campione di feci umane è stato analizzato in singolo nella stessa sessione utilizzando 1 lotto di reattivi del dosaggio LIAISON® Calprotectin. I risultati sono stati analizzati mediante analisi di regressione di Passing e Bablok del metodo di pesatura manuale a confronto con il metodo del device.

Intercetta y (IC 95%)	Pendenza (IC 95%)	Bias a 50 µg/g (IC 95%)	Bias a 120 µg/g (IC 95%)	Correlazione r
-1,12 µg/g (da -2,81 a 0,60)	0,96 (da 0,92 a 1,02)	-2,914 µg/g (da -5,154 a -0,529)	-5,428 µg/g (da -9,575 a -0,450)	0,970

L'analisi di concordanza percentuale eseguita tra i due metodi di estrazione ha prodotto i seguenti risultati.

LIAISON® Q.S.E.T. Device	Estrazione manuale (pesatura)			
	Elevati	Borderline	Normale	Totale
Elevati	36	0	0	36
Borderline	6	23	3	32
Normale	0	7	53	60
Totale	42	30	56	128

Borderline considerati Elevati		Intervallo di confidenza 95%	
Concordanza positiva	(65/72)	90,3%	(81,0% - 96,0%)
Concordanza negativa	(53/56)	94,6%	(85,1% - 99,0%)
Complessiva	(119/128)	93,0%	(87,1% - 96,7%)

Borderline considerati Normali		Intervallo di confidenza 95%	
Concordanza positiva	(36/42)	85,7%	(71,5% - 94,6%)
Concordanza negativa	(86/86)	100%	(95,8% - 100,0%)
Complessiva	(122/128)	95,3%	(90,1% - 98,3%)

19. Bibliografia

1. Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(6):524-534.
2. Van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 2010;341:c3369.
3. Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Biochem Med* 2011;21(3):245-53.
4. Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997;58(2):176-80.
5. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(1):50-4.
6. Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ, Zinsmeister AR. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2000;95(10):2831-7.
7. Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin – a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13557.
8. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, Scalici C, Montalto G, Di Fede G, Rini G, Notarbartolo A, Aversa M. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: A prospective study in adults and children. *Clinical Chemistry* 2003;49(6):861-7.
9. Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Scott D, Fagerhol MK, Roseth A, Bjarnason I. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut* 1999;45:362-6.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C24-A3, Vol.19, No.5, Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline - Third Edition
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP5-A2, Vol.24, No.25, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline - Second Edition
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP17-A2, Vol.32, No.8, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline June 2012 – Second Edition
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP6-A, Vol.23, No.16 Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical Methods; Proposed Guideline- Approved Guideline
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2, Vol.25, No.27 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Second Edition



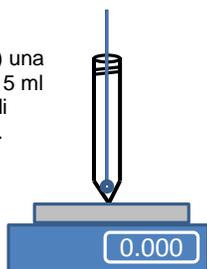
DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

LIAISON® Calprotectin Assay Metodo di pesatura delle feci

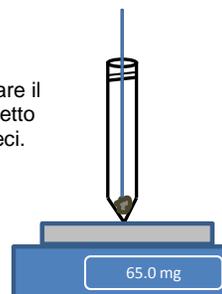
Pesare (tara) una provetta da 15 ml con l'anello di inoculazione.



Servendosi dell'anello di inoculazione trasferire 50-100 mg di materiale fecale nella provetta.

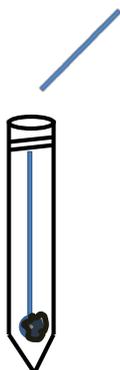


Calcolare il peso netto delle feci.



Aggiungere 1X LIAISON® Q.S.E.T. Buffer

Rompere il manico dell'anello.



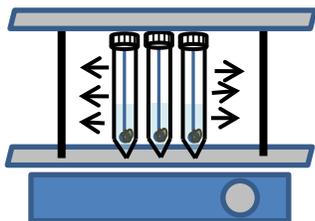
Aggiungere il preparato 1X LIAISON® Q.S.E.T. Buffer (49X peso delle feci). Vedere la Tabella. Tappare.



Peso delle feci (mg)	Volume 1X LIAISON® Q.S.E.T. Buffer (ml)
50	2,5
55	2,7
60	2,9
65	3,2
70	3,4
75	3,7
80	3,9
85	4,2
90	4,4
95	4,7
100	4,9

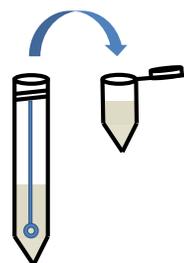
Omogeneizzare

Utilizzando un agitatore vortex multiprovetta omogeneizzare il campione alla regolazione massima per 30 minuti.



Centrifugare

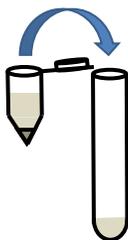
Trasferire 1,0 ml di omogenato in una provetta per microcentrifuga.



Centrifugare per 5 minuti a 3.000xg.

Diluire e analizzare

Trasferire 100 µl del supernatante trasparente dell'estratto in una nuova provetta per campioni.



Aggiungere 850 µl del LIAISON® 1X Extraction Buffer preparato nella provetta e mescolare.



Posizionare la provetta sullo strumento DiaSorin Analyzer appropriato per eseguire l'analisi o consultare la sezione 9 alla voce Istruzioni per l'uso per la conservazione consigliata.

Pulire l'area di lavoro con una soluzione di candeggina al 10% (ipoclorito di sodio allo 0,5%).



Rischio biologico

LIAISON® Calprotectin Assay Metodo basato sul LIAISON® Q.S.E.T. Device

Aggiungere 6 ml del 1X LIAISON® Q.S.E.T. Buffer preparato nel dispositivo.

Tappare.

Capovolgere il dispositivo.

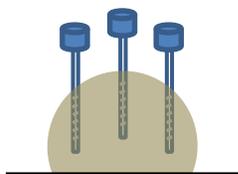


Svitare l'asticella ed estrarla dal dispositivo.

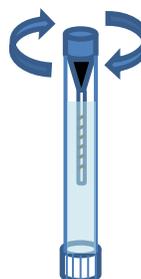


Aggiungere il materiale fecale nel dispositivo

Immergere l'asticella nel campione di feci più volte fino a quando le scanalature non sono completamente coperte. Per le feci liquide, pipettare 12 µl di feci direttamente nel dispositivo. Fare attenzione al fine di assicurare che venga pipettato il volume corretto.

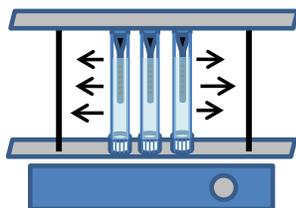


Riavvitare l'asticella sul dispositivo. Il materiale fecale in eccesso verrà rimosso dall'imbuto.

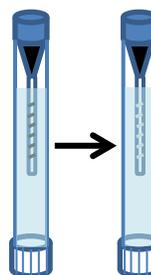


Omogeneizzare il campione

Tenendo il tappo blu rivolto verso l'alto, omogeneizzare in un agitatore vortex multiprovetta alla regolazione massima per 30 minuti.

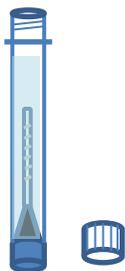


Verificare che non rimangano tracce visibili di materiale fecale nelle scanalature. Se necessario, continuare ad agitare.



Analizzare

Capovolgere il dispositivo e svitare il tappo trasparente.



Posizionare la provetta sullo strumento DiaSorin Analyzer appropriato per eseguire l'analisi o consultare la sezione 9 alla voce Istruzioni per l'uso per la conservazione consigliata.

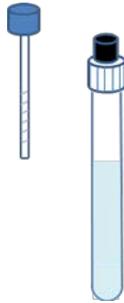
Pulire l'area di lavoro con una soluzione di candeggina al 10% (ipoclorito di sodio allo 0,5%).



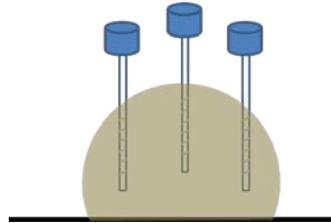
Rischio biologico
Dispositivo monouso

LIAISON® Calprotectin Assay Metodo basato sul LIAISON® Q.S.E.T. Device Plus

Svitare l'asticella ed estrarla dal dispositivo

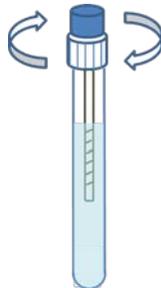


Immergere l'asticella nel campione di feci più volte fino a quando le scanalature non sono completamente coperte.
In caso di feci liquide, svitare il tappo trasparente e pipettare 12 µl di feci direttamente nel dispositivo. Fare attenzione al fine di assicurare che venga pipettato il volume corretto.

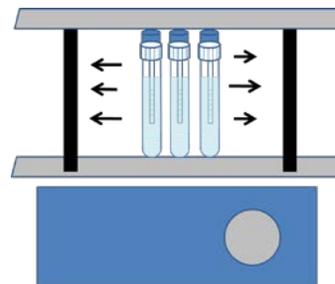


Omogeneizzare il campione

Riavvitare l'asticella sul dispositivo. Il materiale fecale in eccesso verrà rimosso dall'imbuto.

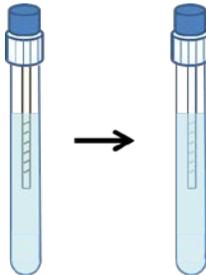


Tenendo il tappo blu rivolto verso l'alto, omogeneizzare in un agitatore vortex multiprovetta alla regolazione massima per 30 minuti.



Controllare il campione

Verificare che non rimangano tracce visibili di materiale fecale nelle scanalature. Se necessario, continuare ad agitare.



Svitare il tappo trasparente e rimuovere l'asticella.



Analizzare

Posizionare la provetta sullo strumento DiaSorin Analyzer appropriato per eseguire l'analisi o consultare la sezione 9 alla voce Istruzioni per l'uso per la conservazione consigliata.

Pulire l'area di lavoro con una soluzione di candeggina al 10% (ipoclorito di sodio allo 0,5%).



Rischio biologico

Dispositivo monouso