

Gentian GCAL® Calprotectin Reagent Kit

REF 1201 e REF 1202

Per uso diagnostico *in vitro* da parte di professionisti di laboratorio.

Il presente documento descrive l'uso generale del prodotto di cui sopra. Per impostazioni specifiche dello strumento, si prega di fare riferimento alle note applicative che vengono rese disponibili su richiesta a marketing@gentian.com.

Scopo previsto

Gentian Calprotectin Immunoassay è un saggio immunoturbidimetrico inteso alla determinazione quantitativa *in vitro* della calprotectina, una proteina dei neutrofili che rappresenta un marcatore di infiammazione, in campioni di plasma trattati con litio eparina e di siero umani. Gentian Calprotectin Immunoassay è inteso a un uso su analizzatori clinici automatizzati da parte di personale qualificato. In un impiego in concerto con altri riscontri laboratoristici e ulteriori valutazioni cliniche, Gentian Calprotectin è stato ideato per essere utilizzato nel coadiuvare la rilevazione e la valutazione dell'infiammazione e di una risposta infiammatoria alle infezioni.

Riepilogo e spiegazione del test

Calprotectina è una proteina eterodimerica S100A8/A9 con una massa molecolare di 24 kDa, consistente nelle due proteine leganti il Ca²⁺, S100A8 e S100A9 (anche denominate proteine correlate a mieloidi 8 e 14 (MRP8 e MRP14)). La calprotectina si riscontra prevalentemente nei neutrofili, dove rende conto approssimativamente del 50% del contenuto in proteine del citosol [1]. I granulociti neutrofili sono fra i primi a rispondere all'infiammazione e alle infezioni batteriche [3]. La calprotectina viene rilasciata da neutrofili attivati, dopo di che i suoi effetti biologici principali sono il sequestro di ioni [3] e il legame al recettore Toll-like 4 (TLR4) e al recettore per i prodotti finali di glicazione avanzata (RAGE), scatenando una risposta infiammatoria [1, 2, 4]. La calprotectina aumenta nel sangue sino a 100 volte in poche ore (in risposta a batteri o endotossine [5]) ed è considerata un importante marcatore di infiammazione [1, 2, 5-7].

La calprotectina indica l'attivazione di fagociti con maggiore sensibilità rispetto ai tradizionali parametri di infiammazione [4]. Vi è, di conseguenza, una forte correlazione con l'infiammazione presente in vari disordini acuti e cronici, il che rende questa proteina un parametro sensibile nella valutazione dell'attività di una malattia e della risposta al trattamento in singoli pazienti [4].

Standardizzazione del calibratore

Non è disponibile alcuno standard internazionale per la calprotectina. Pertanto, la tracciabilità è stabilita in conformità con la sezione 5.6 in ISO 17511 [20], in cui il livello di ingresso metrologico più elevato è la procedura di misurazione selezionata del produttore. Il calibratore è riconducibile a una soluzione di calprotectina ricombinante altamente pura, valore assegnato dalla determinazione della proteina totale tramite UV₂₈₀ e coefficiente di estinzione noto. Un calibratore operativo del materiale ricombinante puro nella matrice del calibratore viene utilizzato con le procedure di misurazione in atto del produttore per assegnare un valore ai calibratori del prodotto attraverso un protocollo di trasferimento del valore pubblicato [8].

Principio del saggio

Gentian Calprotectin Immunoassay è un saggio immunologico turbidimetrico potenziato da particelle (PETIA). Il campione di plasma trattato con litio eparina o il campione di siero viene miscelato con immunoparticelle di calprotectina. La calprotectina del campione e gli anticorpi anti-calprotectina della soluzione di immunoparticelle si legano fra loro per formare aggregati che incrementano la torbidità della soluzione. Il grado di torbidità è proporzionale alla concentrazione di

calprotectina, e questa può essere quantificata grazie a una curva di calibrazione standard prestabilita.

Componenti del kit di saggio

Prodotti forniti	
Gentian GCAL® Calprotectin Reagent Kit	REF 1201
<ul style="list-style-type: none"> R1 Assay Buffer (54 mL) R2 Immunoparticles (9 mL) 	
Gentian GCAL® Calprotectin Reagent Kit S	REF 1202
<ul style="list-style-type: none"> R1 Assay Buffer (30 mL) R2 Immunoparticles (5 mL) 	
Altri prodotti disponibili (non inclusi)	
Gentian GCAL® Calprotectin Calibrator Kit (6 livelli x 1 mL)	REF 1251
Gentian GCAL® Calprotectin Control Kit (2 livelli x 1 mL)	REF 1219

Tutti i prodotti sono pronti all'uso.

Composizione

Tampone di reazione 1 (R1, 54 mL di ingrediente inattivo): Tampone di saggio di Gentian Calprotectin . R1 è una soluzione salina tamponata con acido MOPS [3-(N-morfolino)-propansolfonico], contenente proteine aviarie e conservate con ProClin® 950.

Tampone di reazione 2 (R2, 9 mL di ingrediente attivo): Immunoparticelle di Gentian Calprotectin . R2 contiene una frazione immunoglobulinica purificata diretta contro la calprotectina umana, che è attaccata con legame covalente a nanoparticelle di polistirene. La soluzione è conservata con ProClin® 950.

Identificazione dei pericoli



Pittogrammi di pericoli (CLP):

GHS07

Avvertenza (CLP): Attenzione

Contiene: 2-metilisotiazol-3(2H)-one

Indicazioni di pericolo (CLP)

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza (CLP)

P280 - Proteggere gli occhi, Indossare guanti protettivi, Indossare indumenti protettivi.

P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P305+P351+P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P337+P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Per richiedere la SDS (scheda dati di sicurezza), si prega di contattare Gentian all'indirizzo marketing@gentian.com.

Avvertenze e precauzioni

1. Contiene sostanze di origine umana o animale e deve essere considerato come materiale potenzialmente infettivo. Maneggiare con cautela e smaltire in base alle normative locali.
2. I reagenti contenenti MOPS/Tween (R1) e EDTA (R2) possono essere irritanti per gli occhi, le vie aeree e la pelle. Maneggiare con cautela e non ingerire.
3. R1 contiene proteine aviari. Maneggiare con la dovuta cautela per evitare reazioni allergiche cutanee.
4. L'esposizione potrebbe causare irritazione a livello cutaneo e oculare.
5. Evitare il contatto con materiali non compatibili.
6. Evitare l'esposizione a calore e luce solare diretta.

Ulteriori istruzioni di manipolazione

1. Il presente test è per il solo uso *in vitro* e deve essere maneggiato da professionisti di laboratorio.
2. Utilizzare esclusivamente applicazioni strumentali convalidate e approvate.
3. Non fare uso di prodotti scaduti.
4. Non mescolare reagenti di lotti differenti né scambiare fra loro tappi di reagenti, controlli, calibratori e lotti.
5. Riavvitare saldamente i tappi dopo l'uso di reagenti, calibratori e controlli per evitare l'evaporazione.

Conservazione e stabilità dei reagenti

Tutti i prodotti forniti per il Gentian Calprotectin Immunoassay devono essere conservati a 2-8 °C. La data di scadenza è stampata sulle etichette. Utilizzando uno strumento Architect c4000 (Abbott), la stabilità d'uso del Gentian GCAL® Calprotectin Reagent Kit risultava essere di almeno 4 settimane in uno studio a bordo dello strumento basato sulla linea guida CLSI EP25 [14].

Raccolta e trattamento dei campioni

Il materiale necessario per il campione è plasma trattato con litio eparina o siero. Gentian raccomanda plasma trattato con litio eparina e provette senza gel separatore. Si raccomanda di analizzare i campioni quanto prima possibile. I campioni di siero devono riposare 30 minuti prima della loro processazione. Centrifugare il campione entro 2 ore dal prelievo del sangue e trasferire la frazione di plasma o di siero immediatamente in un'altra provetta. Non utilizzare provette contenenti gel e non contenenti gel in modo interscambiabile. Un'analisi della stabilità del campione mostrava che la calprotectina era stabile per almeno 48 ore dopo centrifugazione a 2-8°C. Miscelare bene i campioni prima di analizzarli.

Caratteristiche di prestazione

I risultati si riferiscono alla principale convalida del Gentian Calprotectin Immunoassay su uno strumento Architect c4000 (Abbott) a livello di una certa area dello strumento con 3 lotti di reagenti, controlli e calibratori, se non diversamente stabilito. Per le specifiche caratteristiche di prestazione dello strumento, si prega di fare riferimento alle specifiche note applicative dello strumento.

Range di misurazione

Il range di misurazione del Gentian Calprotectin Immunoassay è approssimativamente 0,4-20,3 mg/L sia in campioni trattati con litio eparina che nei campioni di siero, con una zona di sicurezza sino a 95 mg/L. L'esatto range di misurazione è specifico per il calibratore e lo strumento, si prega di fare riferimento alla scheda dei valori analitici per gli specifici valori di calibratore del lotto (disponibile su www.gentian.com) e per le specifiche note applicative dello strumento.

Sensibilità analitica

L'analisi della sensibilità analitica del Gentian Calprotectin Immunoassay è stata esaminata in uno studio basato sulla linea guida CLSI EP17 [15]. Il limite di quantificazione (LoQ) è definito come la concentrazione più bassa di un analita che può essere rilevata in modo affidabile e alla quale

l'errore totale soddisfa i requisiti di accuratezza. Il LoQ è stato misurato come 0,31 mg/L in campioni di plasma trattati con litio eparina e 0,30 mg/L in campioni di siero. Per lo specifico LoQ dello strumento, si prega di fare riferimento alle specifiche note applicative dello strumento.

Precisione

La precisione complessiva del Gentian Calprotectin Immunoassay è stata misurata con un CV del <4,0% per campioni >1 mg/L in uno studio basato sulla linea guida CLSI EP05 [16]. Per la specifica precisione complessiva dello strumento, si prega di fare riferimento alle specifiche note applicative dello strumento.

Specificità e limitazioni analitiche

Per questo prodotto, non è rilevata alcuna interferenza con emoglobina, Intralipid o bilirubina alle concentrazioni esaminate in uno studio basato sulla linea guida CLSI EP07 [17]. Per la specifica interferenza dello strumento, si prega di fare riferimento alle specifiche note applicative dello strumento. Non è stata rilevata alcuna interferenza con i farmaci esaminati su raccomandazione di Sonntag and Scholer [9]. Dal momento che gli anticorpi nel Gentian Calprotectin Immunoassay sono di origine aviaria, non vi è interferenza dovuta al fattore reumatoide presente nei campioni [10]. La reattività crociata con MRP8, MRP14 e S100A12 risultava essere < 1% in uno studio che includeva 4 campioni, nel rispetto di un protocollo basato sulla linea guida CLSI EP07.

Confronto metodologico

I risultati ottenuti con il Gentian Calprotectin Immunoassay sullo strumento Architect c4000 (Abbott) sono stati confrontati con i risultati dello strumento spettrofotometrico IDK® Calprotectin ELISA Test™ (Immundiagnostik) Multiskan 60 (Thermo Fisher) in uno studio con 1 lotto di reagenti, basato sulla linea guida CLSI EP09 [18]. Per via della mancanza di calibratori internazionali o procedure di riferimento, è stato valutato soltanto il coefficiente di determinazione R².

Tipo di campione	n	Range dei campioni [mg/L]	R ² Co-efficiente
Plasma trattato con Li-Eparina	78	0,7 - 31,9	0,83
Siero	99	0,6 - 27,8	0,89

Procedura di saggio

Note applicative

Le applicazioni del Gentian Calprotectin Immunoassay sono state stabilite su svariati analizzatori in uso in chimica clinica. Note applicative dettagliate e convalidate che descrivono le procedure per l'installazione e l'analisi su specifici strumenti sono rese disponibili su richiesta da marketing@gentian.com. Per istruzioni sulle modalità di installazione di una nuova applicazione, consultare il manuale dello strumento. Manutenzione, funzionamento e precauzioni d'uso devono conformarsi ai manuali dello specifico strumento.

Preparazione dei reagenti

I reagenti sono pronti per l'uso. Miscelare delicatamente i reagenti prima di porli nelle relative posizioni assegnate. I flaconi di reagente possono adattarsi direttamente nello strumento, se non altrimenti indicato nelle note applicative.

Definizione della curva di calibrazione

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del Gentian GCAL® Calprotectin Calibrator Kit (REF 1251) disponibili su www.gentian.com.

Controlli di qualità

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del Gentian GCAL® Calprotectin Control Kit (REF 1219) disponibili su www.gentian.com.

Misurazione dei campioni dei pazienti

Una volta stabilita una calibrazione valida e quando i valori dei controlli rientrano nel range valido, è possibile misurare i campioni di plasma trattati con litio eparina o i campioni di siero. Verificare che in provette/tubi vi sia il volume minimo di campione e analizzare i campioni secondo le istruzioni fornite nel manuale d'uso.

Risultati

I risultati sono calcolati automaticamente dallo strumento per tutte le applicazioni stabilite per il Gentian Calprotectin Immunoassay. I risultati sono presentati in mg/L.

Prestazione clinica

La prestazione clinica del Gentian Calprotectin Immunoassay è stata valutata in studi clinici [11-13]. Specifici cut-off e caratteristiche di prestazione clinica sono riassunti qui più avanti.

Specificazioni cliniche, ivi compresi cut-off e caratteristiche di prestazione, dipendono dal tipo di campione e dall'ambito precipuo della malattia in questione. Si raccomanda, pertanto, che ciascun laboratorio determini valori di cut-off *in loco*, dal momento che i valori possono variare a seconda del tipo di campione, della popolazione esaminata e del punto di decisione clinica.

Havelka A, et al. *Scientific reports*. 2020 [11].

Discriminazione fra pazienti con polmonite batterica e pazienti con infezioni respiratorie virali

Parametro	Valore	CI 95%
Cut-off [mg/L]	2,37	
Area ROC	0,775	[0,667; 0,861]
Sensibilità [%]	60	[44; 75]
Specificità [%]	79	[63; 90]
LR+	2,9	[1,5; 5,6]
LR-	0,5	[0,3; 0,8]
PPV [%]	84*	
NPV [%]	53*	

Abbreviazioni: ROC: curva delle caratteristiche operative del ricevitore, LR+: rapporto di verosimiglianza per un risultato positivo, LR-: rapporto di verosimiglianza per un risultato negativo

*Calcolato sulla base della prevalenza di infezioni batteriche da un campione dello studio: 64% (71/((71 + 40)))

Discriminazione fra pazienti con infezione da *Mycoplasma pneumoniae* e pazienti con infezioni respiratorie virali

Parametro	Valore	CI 95%
Cut-off [mg/L]	2,37	
Area ROC	0,883	[0,774; 0,952]
Sensibilità [%]	91	[71; 99]
Specificità [%]	77	[67; 93]
LR+	3,9	[2,2; 7,1]
LR-	0,12	[0,03; 0,4]
PPV [%]	70*	
NPV [%]	93*	

Abbreviazioni: ROC: curva delle caratteristiche operative del ricevitore, LR+: rapporto di verosimiglianza per un risultato positivo, LR-: rapporto di verosimiglianza per un risultato negativo

*Calcolato sulla base della prevalenza di infezioni da *Mycoplasma* da un campione dello studio: 38% (24/((24 + 40)))

Lo studio includeva 279 soggetti (144 controlli asintomatici in salute, 71 con infezioni batteriche, 24 con infezioni da *Mycoplasma* e 40 con infezioni virali). I controlli di inclusione per i pazienti dello studio erano febbre > 38°C e segni e sintomi di infezione respiratoria.

Tipo di campione: Plasma trattato con litio eparina
Strumento: Mindray BS380

de Guadiana Romualdo LG, et al. *J Infect*. 2020 [12].

Previsione di mortalità in pazienti affetti da COVID-19

Parametro	Valore	CI 95%
Cut-off [mg/L]	3,9	
Area ROC	0,801	[0,691; 0,894]
Rapporto OR non corretto	13,30	[1,53; 116]

Abbreviazioni: ROC: curva delle caratteristiche operative del ricevitore, OR: rapporto degli odds

Questo studio includeva 66 pazienti consecutivi, ricoverati con infezione confermata da SARS-CoV-2. 8 dei 66 pazienti affetti da COVID-19 sono andati incontro a morte durante la permanenza in ospedale e 9 dei 66 pazienti affetti da COVID-19 hanno richiesto ventilazione meccanica.

Tipo di campione: Siero
Strumento: Roche c502

de Guadiana Romualdo LG, et al. *Inflamm Res*. 2022 [13].

Predizione di necessità di ventilazione meccanica

Parametro	Valore	CI 95%
Cut-off* [mg/L]	2,98	
Area ROC	0,723	[0,652; 0,790]
Sensibilità [%]	73,7	[60,3; 84,5]
Specificità [%]	60,4	[54,9; 65,6]
PPV [%]	23,9	[17,8; 30,9]
NPV [%]	93,2	[89,0; 96,1]

Abbreviazioni: ROC: curva delle caratteristiche operative del ricevitore

* Cut-off ottimale secondo l'indice di Youden

Criterio di esclusione di necessità di ventilazione meccanica

Parametro	Valore	CI 95%
Cut-off* [mg/L]	2,23	
Sensibilità [%]	86,0	[74,2; 93,7]
NPV [%]	94,7	[89,7; 96,4]

Abbreviazioni: ROC: curva delle caratteristiche operative del ricevitore

* Cut-off ottimale per escludere la necessità di ventilazione meccanica invasiva

Questo studio multicentrico include 395 pazienti ricoverati consecutivamente nell'ospedale con infezione da SARS-CoV-2 confermata. 57 di questi pazienti COVID-19 hanno necessitato di ventilazione meccanica invasiva.

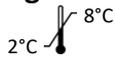
Tipo di campione: Siero
Strumento: Roche Cobs c702

Limite di riferimento superiore

I valori di calprotectina previsti in una popolazione adulta normale sono stati determinati in uno studio usando un protocollo basato sulla linea guida C28 del CLSI [19] su uno strumento Cobas c501 (Roche). L'intervallo di riferimento è stato determinato da una popolazione di soggetti apparentemente sani. Sono stati misurati un totale di 416 campioni da individui (52% di sesso maschile, 48% di sesso femminile) con età compresa tra 16 e 80 anni. I campioni usati erano plasma litio eparina e siero usando provette sia con che senza gel (51 litio eparina senza gel, 163 litio eparina con gel, 51 siero senza gel, 151 siero con gel). Il limite superiore di riferimento è stato calcolato in modo parametrico per rappresentare il 97,5% superiore della popolazione. Si raccomanda che ciascun laboratorio determini un limite di riferimento locale poiché tali valori possono variare in base alla popolazione testata.

Tipo di campione	Valore
Plasma litio eparina senza gel	<0,97 mg/L
Plasma litio eparina con gel	<1,69 mg/L
Siero senza gel	<1,41 mg/L
Siero con gel	<1,75 mg/L

Legenda dei simboli



Limiti di temperatura



Data di scadenza



Consultare le istruzioni per l'uso



Produttore



Numero dell'Ente notificato con marchio CE



Marchio UKCA



Rappresentante autorizzato per la Svizzera



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*



Numero di lotto



Numero di catalogo



Identificatore unico di dispositivo



Contenuto



R1 Tampone di saggio



R2 Immunoparticelle



Attenzione



Bjornasveien 5
N-1596 Moss
Norvegia
TEL: +47 99 33 99 05
www.gentian.com



Rappresentanti

Responsabile per il Regno Unito
Emergo Consulting (UK) Limited
c/o Cr360 – UL International
Compass House, Vision Park Histon
Cambridge CB24 9BZ
Regno Unito



MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Svizzera

Bibliografia

1. Stríz I, Trebichavský I. *Physiol Res.* 2004;53(3):245-53.
2. Wang S, et al. *Front Immunol.* 2018;9:1298.
3. Teng TS, et al. *J Immunol Res.* 2017;2017:9671604.
4. Zackular JP, et al. *J Biol Chem.* 2015;290(31):18991-8.
5. Johne B, et al. *Mol Pathol.* 1997;50(3):113-23.
6. Pruenster M, et al. *Pharmacol Ther.* 2016;167:120-31.
7. Foell D, et al. *Clin Chim Acta.* 2004;344(1-2):37-51.
8. Blirup Jensen et al. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(10):1470-1479
9. Sonntag O, Scholer A. *Ann Clin Biochem* 2001;38:376-85.
10. Larsson A, et al. *Poultry Science* 1993;72:1807-18
11. Havelka A, et al. *Scientific reports.* 2020;10(1):4208-
12. de Guadiana Romualdo LG, et al. *J Infect.* 2020;S0163-4453(20)30543-0.
13. de Guadiana-Romualdo LG, et al. *Inflamm. Res.* 2022;71(1):57-67.
14. CLSI. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline. CLSI document EP25-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
15. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute ;2012
16. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2014
17. CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry. 3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2018.
18. CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. 3rd ed. CLSI guideline EP09c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
19. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document C28-A3c. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008
20. EN ISO 17511:2021 In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples. (ISO 17511:2020)

Incidenti gravi

Si prega di segnalare al produttore e all'autorità competente l'eventuale verificarsi di incidenti gravi correlati al dispositivo.

Modifica rispetto alla versione precedente

- Nuovi dati di performance cliniche del 2022, vedi riferimento 13
- Aggiunta del numero dell'Ente notificato al marchio CE
- Aggiunta del marchio UKCA
- Aggiunta della sezione "Rappresentanti"
- Aggiunti riferimenti CLSI 14-19 e riferimento ISO 20.
- Aggiunto punto 4-6 in Avvertenze e precauzioni.
- Modifiche editoriali e correzioni minori in tutto il documento.

Data del rilascio

2023-03-01