
CERTEST FOB+Transferrin + Calprotectin+ Lactoferrin

ONE STEP FOB, Transferrin,
Calprotectin and Lactoferrin
COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



For Information Only Purposes





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous semi-qualitative detection of human haemoglobin (hHb), human transferrin (hTf), human calprotectin (hCp) and human lactoferrin (hLf) in stool samples.

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin combo card test offers a simple, highly sensitive and non-invasive screening assay to make a presumptive diagnosis of gastrointestinal bleeding and inflammatory disorder caused by colorectal cancer.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is the second leading cause of illness and death in the Western world. The screening using fecal occult blood tests is based on the bleeding detection, as important symptom of colonic neoplasm, either at an early-stage cancer or large adenomatous polyps. Colorectal cancer is also associated with local acute inflammatory reaction being visualized, in some cases, by white cell neutrophil scanning.

Haemoglobin is the iron-containing oxygen-transport protein in the red blood cells of all vertebrates that may be leaked into gastrointestinal tract and then discharged with the faeces in gastrointestinal bleeding diseases.

Transferrin is a blood-derived component that may be leaked into gastrointestinal tract and then discharged with the faeces in gastrointestinal bleeding diseases. Transferrin is stable in faeces and a good marker to detect loss of blood from the upper and lower intestine (gastrointestinal bleeding).

When gastrointestinal blood is lost, the stool will contain a combination of intact or nearly intact haemoglobin, intact heme, and heme-derived porphyrins in amounts that depend on the site, the amount of bleeding and the transit time through the gut. Immunochemical tests detect intact or nearly intact human haemoglobin, being a very specific technique to detect the loss of blood from the lower intestine, because blood from lower sites is less degraded during transit. The haemoglobin is unstable in faeces, leading to false negative results. The detection of fecal transferrin, which is more stable than haemoglobin, provides an alternative way of diagnosing the disease in the upper digestive tract.

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

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

The hCp and hLf markers are useful for the differentiation between functional (for example: irritable bowel syndrome) and organic disease (for example inflammatory bowel disease).

Gastrointestinal inflammatory disorders also include Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Suspicion is raised in patients with persistent (4 weeks) or recurrent (2 episodes in six months) abdominal pain and diarrhea. Additionally, rectal bleeding, weight loss or anemia increase the probability of the condition. Endoscopic evaluation with histopathological sampling is generally considered indispensable to diagnosis patients with gastrointestinal inflammation disorder suspicion.

TEST PRINCIPLE

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin is based on the principle of a semi-quantitative immunochromatographic assay for the determination of human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin in stool samples.

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

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





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

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

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

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

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

Whether the sample is positive or not, in the four strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on the four membranes will capture control green-conjugate complex and the four control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

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

PRECAUTIONS

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

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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



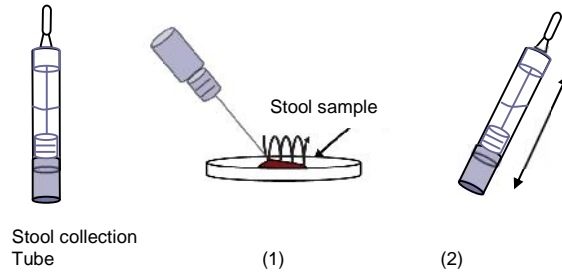


CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the stool collection tube and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (1), to collect faecal sample and add it to the stool collection tube. For liquid samples, add approx. 15µL in the collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (2). The stool collection vial with dilute sample can be stored for 7 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.



Precautions: Patients should not collect samples during their menstrual period if they have bleeding hemorrhoids, blood in urine or if they have strained during bowel movement.

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

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

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

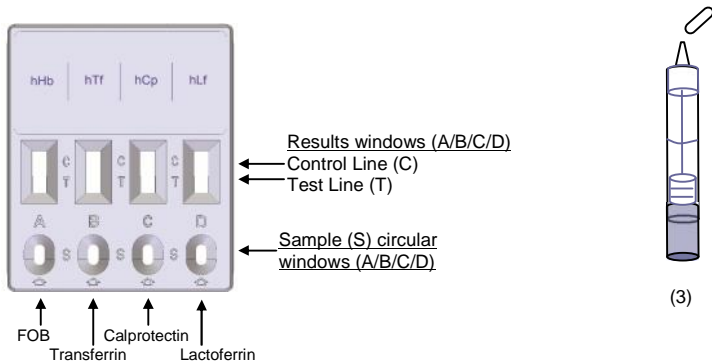
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

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

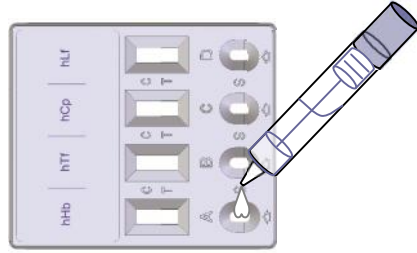
1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, cut the end of the cap (3) and, using each time the same tube, dispense 4 drops in the circular window marked with the letter A (4), 4 drops in the circular window marked with the letter B (5), 4 drops in the circular window marked with the letter C (6) and 4 drops in the circular window marked with the letter D (7). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

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



FOB Strip A-procedure

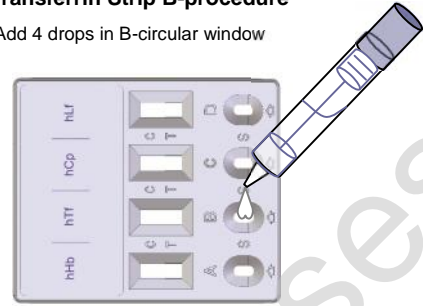
Add 4 drops in A-circular window



(4)

Transferrin Strip B-procedure

Add 4 drops in B-circular window



(5)

Calprotectin Strip C-procedure

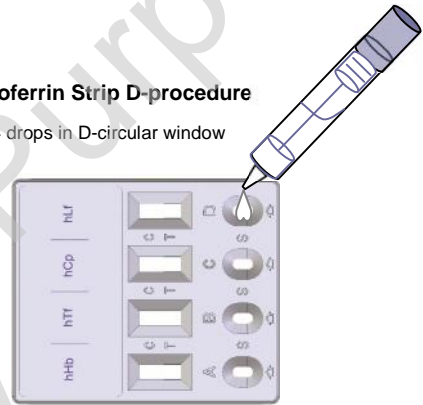
Add 4 drops in C-circular window



(6)

Lactoferrin Strip D-procedure

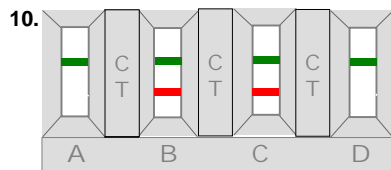
Add 4 drops in D-circular window



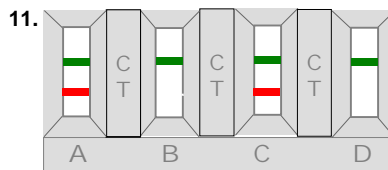
(7)

INTERPRETATION OF RESULTS (please refer to the illustration below)

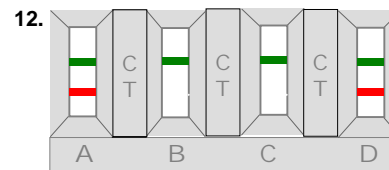
- A: Green→Negative hHb
 B: Green→Negative hTf
 C: Green→Negative hCp
 D: Green→Negative hLf
- A: Green/Red→Positive hHb
 B: Green/Red→Positive hTf
 C: Green/Red→Positive hCp
 D: Green/Red→Positive hLf
- A: Green/Red→Positive hHb
 B: Green/Red→Positive hTf
 C: Green/Red→Positive hCp
 D: Green→Negative hLf
- A: Green/Red→Positive hHb
 B: Green/Red→Positive hTf
 C: Green→Negative hCp
 D: Green/Red→Positive hLf
- A: Green/Red→Positive hHb
 B: Green→Negative hTf
 C: Green/Red→Positive hCp
 D: Green/Red→Positive hLf
- A: Green→Negative hHb
 B: Green/Red→Positive hTf
 C: Green/Red→Positive hCp
 D: Green/Red→Positive hLf
- A: Green/Red→Positive hHb
 B: Green/Red→Positive hTf
 C: Green→Negative hCp
 D: Green→Negative hLf
- A: Green→Negative hHb
 B: Green→Negative hTf
 C: Green/Red→Positive hCp
 D: Green/Red→Positive hLf
- A: Green→Negative hHb
 B: Green/Red→Positive hTf
 C: Green→Negative hCp
 D: Green/Red→Positive hLf



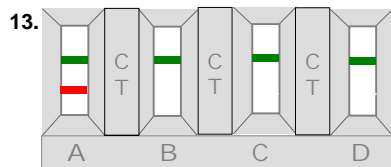
A: Green→Negative hHb
B: Green/Red→Positive hTf
C: Green/Red→Positive hCp
D: Green→Negative hLf



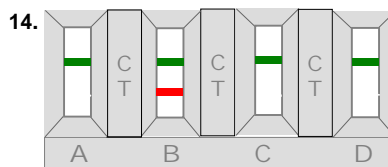
A: Green/Red Positive hHb
B: Green→Negative hTf
C: Green/Red→Positive hCp
D: Green→Negative hLf



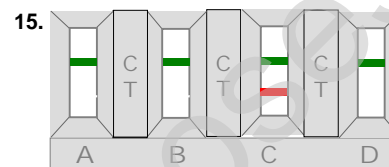
A: Green/Red→Positive hHb
B: Green→Negative hTf
C: Green→Negative hCp
D: Green/Red→Positive hLf



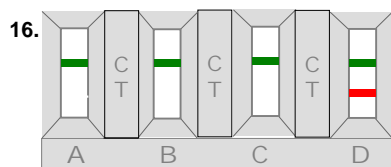
A: Green/Red→Positive hHb
B: Green→Negative hTf
C: Green→Negative hCp
D: Green→Negative hLf



A: Green→Negative hHb
B: Green/Red→Positive hTf
C: Green→Negative hCp
D: Green→Negative hLf



A: Green→Negative hHb
B: Green→Negative hTf
C: Green/Red→Positive hCp
D: Green→Negative hLf



A: Green→Negative hHb
B: Green→Negative hTf
C: Green→Negative hCp
D: Green/Red→Positive hLf

	A (hHb)	B (hTf)	C (hCp)	D (hLf)	Interpretation of the results
1.	-	-	-	-	No occult blood presence (no haemoglobin, transferrin presence→no gastrointestinal bleeding). No active gastrointestinal inflammation disorder (no calprotectin, lactoferrin presence).
	GREEN	GREEN	GREEN	GREEN	
2.	+	+	+	+	Patient stool sample contains haemoglobin, transferrin, calprotectin and lactoferrin markers, which might mean gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by Ulcerative Colitis, Crohn's disease, some types of carcinomas (colorectal cancer), ulcers or bacterial infections (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC) or <i>C. difficile</i>).
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN-RED	
3.	+	+	+	-	Patient stool sample contains haemoglobin, transferrin and calprotectin markers, which might mean gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD, UC or some carcinoma (e.g. colorectal cancer).
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN	
4.	+	+	-	+	Patient sample contains haemoglobin, transferrin and lactoferrin markers, which might mean gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD or UC, some type of carcinoma (e.g. colorectal cancer) and with persistent diarrhea: bacterial enteropathies (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC) or <i>C. difficile</i>).
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN	GREEN-RED	
5.	+	-	+	+	Patient stool sample contains haemoglobin, calprotectin and lactoferrin markers, which might mean lower gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD, UC, some carcinoma (e.g. colorectal cancer) and with persistent diarrhoea: bacterial enteropathies (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC) or <i>C. difficile</i>).
	GREEN-RED	GREEN	GREEN-RED	GREEN-RED	
6.	-	+	+	+	Patient stool sample contains transferrin, calprotectin and lactoferrin markers, which might mean upper gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD (no UC), some carcinoma (e.g. gastric cancer) and with persistent diarrhoea: bacterial enteropathies (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC) or <i>C. difficile</i>).
	GREEN	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN-RED	



CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

7.	+	+	-	-	Patient stool sample contains haemoglobin and transferrin markers, which might mean gastrointestinal bleeding problems caused by some bacterial infections or some carcinomas without inflammation or some traumas.
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN	GREEN	
8.	-	-	+	+	Patient stool sample contains calprotectin and lactoferrin markers, which might mean organic gastrointestinal inflammation caused by ulcerative colitis, Crohn's disease, some types of carcinomas or bacterial enteropathies (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC), or <i>C. difficile</i>).
	GREEN	GREEN	GREEN-RED	GREEN-RED	
9.	-	+	-	+	Patient stool sample contains transferrin and lactoferrin markers, which might mean upper gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD (no UC), some carcinoma (e.g. gastric cancer) and with persistent diarrhea bacterial enteropathies (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC) or <i>C. difficile</i>).
	GREEN	GREEN-RED	GREEN	GREEN-RED	
10.	-	+	+	-	Patient stool sample contains transferrin and calprotectin markers, which might mean upper gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD or some carcinoma (e.g. gastric cancer).
	GREEN	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN	
11.	+	-	+	-	Patient stool sample contains haemoglobin and calprotectin markers, which might mean lower gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD, UC or some carcinoma (e.g. colorectal cancer).
	GREEN-RED	GREEN	GREEN-RED	GREEN	
12.	+	-	-	+	Patient stool sample contains haemoglobin and lactoferrin markers, which might mean lower gastrointestinal bleeding and inflammation (organic disease) caused by CD, UC, some carcinoma (e.g. colorectal cancer) and with persistent diarrhea: bacterial enteropathies (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> (EIEC or EAEC) or <i>C. difficile</i>).
	GREEN-RED	GREEN	GREEN	GREEN-RED	
13.	+	-	-	-	Patient stool sample contains haemoglobin marker, which might mean lower gastrointestinal bleeding disease (e.g. early stage colorectal cancer). The concentration of human transferrin in blood is 100 times less than human haemoglobin, not too much blood present in faeces.
	GREEN-RED	GREEN	GREEN	GREEN	
14.	-	+	-	-	Patient stool sample contains transferrin marker, which might mean upper gastrointestinal bleeding (e.g. caused by gastric cancer). Human haemoglobin probably degraded in the gastrointestinal tract.
	GREEN	GREEN-RED	GREEN	GREEN	
15.	-	-	+	-	Patient stool sample contains calprotectin marker, which might mean some gastrointestinal inflammation (e.g. Crohn's disease, ulcerative colitis, etc.), without gastrointestinal bleeding and colorectal cancer presence.
	GREEN	GREEN	GREEN-RED	GREEN	
16.	-	-	-	+	Patient stool sample contains lactoferrin marker, which might mean some gastrointestinal inflammation (bacterial enteropathy), without gastrointestinal bleeding presence.
	GREEN	GREEN	GREEN	GREEN-RED	
17.	Any other result				Invalid result either A, B, C or D, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

Whatever result detailed in the above-mentioned table (2 to 16) should be followed up with additional confirmatory diagnostic procedures to determine the exact cause and source of the blood or inflammation markers in the patient sample.

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

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

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

QUALITY CONTROL

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





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of stool sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high human haemoglobin/transferrin/calprotectin/lactoferrin concentration to faint when the human haemoglobin/transferrin/calprotectin/lactoferrin concentration is close to the cut-off value of the test.
4. CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results, in haemoglobin and/or transferrin, determine the presence of human haemoglobin and/or human transferrin in faecal samples; nevertheless, it can be due to several causes, besides colorectal bleeding, such as hemorrhoids, blood in urine or stomach irritations. A positive result should be followed up with additional diagnostic procedures to determine the exact cause and source of the blood in the stool.
6. Positive results, in calprotectin and/or lactoferrin, determine the presence of human calprotectin or/and human lactoferrin in faecal samples; nevertheless, it can be due to several causes (Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and some enteropathies). A positive result should be followed up with additional diagnostic invasive procedures, a colonoscopy and a biopsy in order to confirm the diagnosis and to establish the inflammation extent.
7. A negative result, in haemoglobin and/or transferrin, is not meaningful because of it is possible the haemoglobin or transferrin concentration in the stool sample is lower than cut-off values. Negative results do not exclude bleeding, as some polyps and colorectal cancers may bleed intermittently or not during certain stages of the disease. Moreover, blood may not uniformly distributed in stool samples.
8. A negative result, in calprotectin and/or lactoferrin, is not meaningful because of it is possible the human calprotectin or human lactoferrin concentration in the stool sample is lower than cut-off values. If symptoms or situation still persist, calprotectin and lactoferrin determination should be carried out invasive techniques. Negative results do not exclude inflammation, some diseases such as celiac sprue and microscopic colitis polyps that involve mainly mononuclear inflammation.
9. Stool from patients with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) treatment could show positive calprotectin result.
10. Lactoferrin is a component of breast milk; the test will be positive in breast fed children and should not be used to evaluate neonates receiving breast milk.
11. Neonatal faecal calprotectin levels have been reported higher than normal in children with a median of 167µg/g (range 22-860µg/g).
12. Stool from patients with active inflammatory bowel diseases that usually involve significant neutrophilic inflammation of the intestine, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, would be positive for faecal calprotectin (the level of human calprotectin in Crohn's disease is higher than in ulcerative colitis) and would be positive for faecal lactoferrin. CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin could be sensitive for this diagnosis in patients with chronic diarrhea.
13. Patients should not collect samples during their menstrual period, if they have bleeding hemorrhoids, blood in urine or if they have strained during bowel movement.

EXPECTED VALUES

Colorectal cancer affects both men and women of all racial and ethnic groups, being most often found in people aged 50 years or older. Regarding men, colorectal cancer is the third most common cancer after prostate and lung cancers. Regarding women, colorectal cancer is the third most common cancer after breast and lung cancers.

Some studies established equal or higher 5.1µg hHb/g faeces for haemoglobin and 0.4µg hTf/g faeces for transferrin as cut-off values to allow detect adult patients with gastrointestinal bleeding that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures.

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

Cut-off values of CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin are 50ng/mL (5.1µg hHb/g faeces) for human haemoglobin, 4ng/mL (0.4µg hTf/g faeces) for human transferrin, 500ng/mL (50µg hCp/g faeces) for human calprotectin and 100ng/mL (10µg hLf/g faeces) for human lactoferrin.





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

Clinical sensitivity and specificity (Strip A and Strip B)

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin, CerTest) and others commercial rapid tests (ImmunTech OcculTech, YD Diagnostics, and Human Hexagon, OBTI). The results were as follows:

		IC test: ImmunTech OcculTech			
			+	-	Total
CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Haemoglobin)	+		10	0	10
	-		0	10	10
	Total		10	10	20

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Haemoglobin) vs ImmunTech OcculTech	>99%	>99%	>99%	>99%

		IC test: Human Hexagon			
			+	-	Total
CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Transferrin)	+		10	0	10
	-		0	14	14
	Total		10	14	24

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Transferrin) vs. Human Hexagon	>99%	>99%	>99%	>99%

Clinical sensitivity and specificity (Strip C, Strip D)

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin, CerTest), and other commercial immunoassays (Calprest®, Eurospital and IBD EZ VUE®, TechLab®). The results were as follows:

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





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Calprotectin) vs Calprest®	>94%	93%	>94%	93%

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

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Lactoferrin) vs IBD EZ VUE®	>99%	>99%	>99%	>99%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin using CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin.

Cross reactivity

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

- Human haemoglobin strip no cross reactivity with:

Bovine and pig haemoglobin	Human lactoferrin
Human calprotectin	Human transferrin
- Human transferrin strip no cross reactivity with:

Bovine and pig haemoglobin	Human haemoglobin
Human calprotectin	Human lactoferrin

No special diet is recommended prior to testing. There are not interferences with any foods (vitamin C, broccoli, carrots...).

- Human calprotectin strip no cross reaction with:

Bovine and pig haemoglobin	Human haemoglobin
Bovine lactoferrin	Human lactoferrin
Bovine and pig transferrin	Human transferrin
- Human lactoferrin strip no cross reactivity with:

Bovine and pig haemoglobin	Human calprotectin
Bovine lactoferrin	Human haemoglobin
Bovine and pig transferrin	Human transferrin



ESPAÑOL

USO PREVISTO

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección semi-cuantitativa simultánea de hemoglobina humana (hHb), transferrina humana (hTf), calprotectina humana (hCp) y lactoferrina humana (hLf) en muestras de heces.

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo, de alta sensibilidad y no invasivo para realizar un diagnóstico presuntivo de un posible sangrado gastrointestinal e inflamación gastrointestinal causado por cáncer colorrectal.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es la segunda causa principal de enfermedad y muerte en el mundo occidental. El cribado o screening, cuando se usan los tests de sangre oculta en heces, está basado en la detección de sangrado en heces; síntoma importante de los neoplasmas del colon, el cáncer en su etapa inicial y los pólipos adenomatosos del intestino. El cáncer colorrectal también está asociado con una reacción inflamatoria local y aguda que en algunos casos puede determinarse mediante la detección de neutrófilos (glóbulos blancos).

La hemoglobina es una proteína de los glóbulos rojos que contiene hierro y cuya función es transportar el oxígeno en todos los vertebrados. Puede ser liberada en el tracto gastrointestinal y eliminada a través de las heces, en las enfermedades asociadas a un sangrado gastrointestinal.

La transferrina es un componente derivado de la sangre que puede llegar al tracto gastrointestinal y eliminarse mediante las heces, a causa de algunas enfermedades gastrointestinales asociadas a la pérdida de sangre. La transferrina es estable en las heces y un buen marcador para detectar pérdidas de sangre en la zona alta y baja del intestino (sangrado gastrointestinal).

Cuando hay una pérdida de sangre gastrointestinal, las heces contendrán una mezcla de hemoglobina no degradada o poco degradada, grupos hemo intactos, y porfirinas hemo-derivadas en cantidades que dependen de la localización del sangrado, de la cantidad y del tiempo de tránsito a través del intestino. Los tests inmunoquímicos detectan hemoglobina humana no degradada o casi intacta, siendo unas técnicas muy específicas para detectar las pérdidas de sangre localizadas en la parte final del intestino. La sangre procedente de este lugar sufre menor degradación durante su tránsito. La hemoglobina es inestable en heces, pudiendo provocar falsos negativos. La detección de transferrina "fecal", más estable que la hemoglobina, proporciona una forma alternativa para diagnosticar enfermedades localizadas en la parte alta del tracto digestivo.

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 una situación de inflamación intestinal. La proteína, una vez liberada hasta su degradación, se mantiene estable a temperatura ambiente durante 7 días en las heces, por ello es el analito ideal. La calprotectina se libera por activación de los leucocitos, lo que conlleva un aumento de su nivel en plasma, líquido cerebro espinal, líquido sinovial, 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, 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*, *Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)* and *enteroagregativa (EAEC)*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile*. Estos marcadores, hCP y hLF, pueden servir de ayuda en el diagnóstico diferencial de pacientes con enfermedad funcional (p.ej. síndrome intestino irritable) y de pacientes con enfermedad orgánica (p.ej. enfermedad inflamatoria intestinal).

La enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC) se incluyen dentro del grupo de enfermedades inflamatorias gastrointestinales. Pacientes con dolor abdominal y diarrea persistente (4 semanas) o recurrente (2 episodios en 6 meses) son sospechosos de padecer estas enfermedades. Además de estos síntomas, el sangrado rectal, la pérdida de peso o la aparición de anemia aumentan la probabilidad de la presencia de estas enfermedades. En este caso, es indispensable una evaluación endoscópica tomando una muestra histopatológica para poder diagnosticar estos pacientes sospechosos.



CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin es una prueba semi-cuantitativa inmunocromatográfica para la determinación de hemoglobina humana, transferrina humana, 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 hemoglobina 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 de la línea del test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a hemoglobina 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 transferrina 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 de la línea del test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a transferrina 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 C 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 de la línea del 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 D consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a lactoferrina 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 de la línea del 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 hemoglobina humana positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-hemoglobina humana-microesferas rojas de látex) en la tira A, si la muestra es transferrina humana positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-transferrina humana-microesferas rojas de látex) en la tira B, 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 C 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 D, 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-hemoglobina humana presentes en la membrana de la tira A (línea de test), los anticuerpos anti-transferrina humana presentes en la membrana de la tira B (línea del test), los anticuerpos anti-calprotectina humana presentes en la membrana de la tira C (línea del test) y los anticuerpos anti-lactoferrina humana presentes en la membrana de la tira D (línea del test), capturarán los complejos coloreados del test y la línea roja aparecerá en las tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de hemoglobina, ni de transferrina, ni de calprotectina, ni de 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-hemoglobina, anti-transferrina, anti-calprotectina y anti-lactoferrina humanas presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán los antígenos-complejos coloreados rojo (no formados) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en las cuatro 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 las cuatro 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

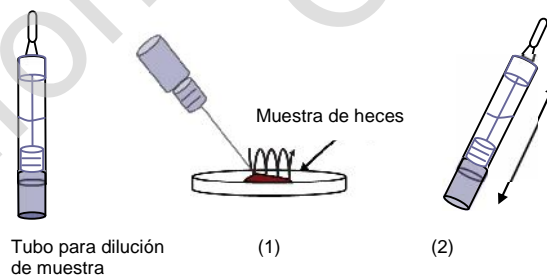
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada una de las muestras para evitar errores 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 FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin combo card 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 considerable 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 FOB+Transferrin+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

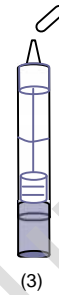
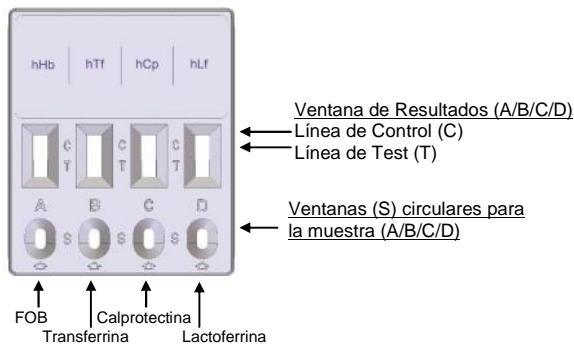
PROCEDIMIENTO

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 FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin de su envase antes de utilizarlo.

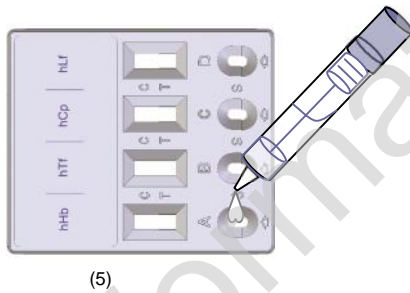
- Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (3), usando el mismo tubo cada vez, añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (4), añadir 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra B (5), añadir 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra C (6) y añadir 4 gotas en la ventana circular marcada con la letra D (7), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
- 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.



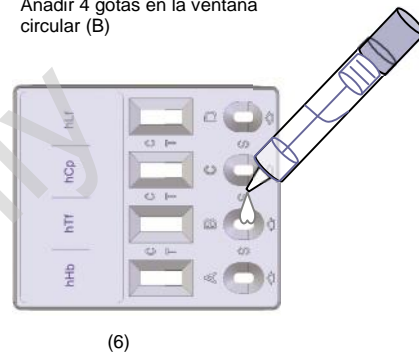
Procedimiento Tira A FOB

Añadir 4 gotas en la ventana circular (A)



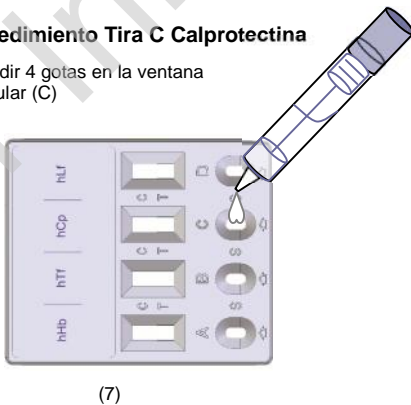
Procedimiento Tira B Transferrina

Añadir 4 gotas en la ventana circular (B)



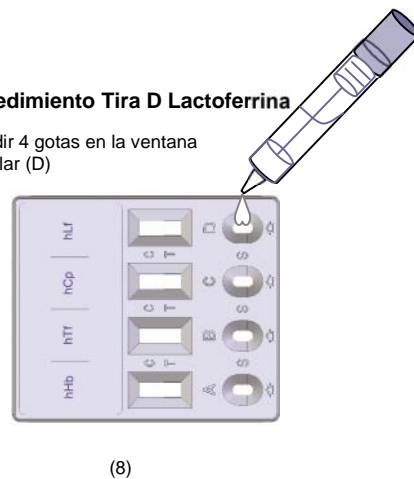
Procedimiento Tira C Calprotectina

Añadir 4 gotas en la ventana circular (C)

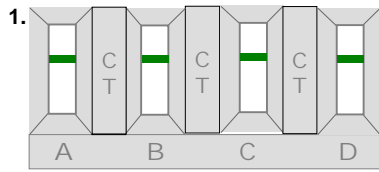


Procedimiento Tira D Lactoferrina

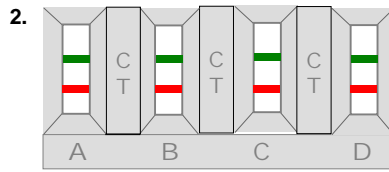
Añadir 4 gotas en la ventana circular (D)



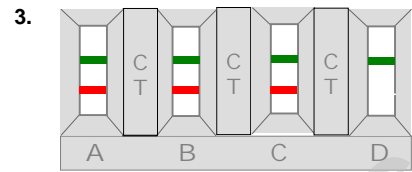
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)



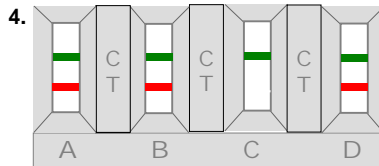
A: Verde→Negativo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde→Negativo hLf



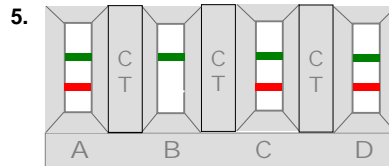
A: Verde/Rojo→Positivo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



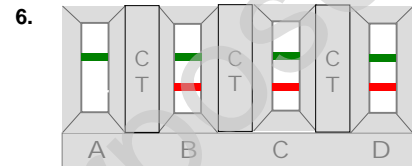
A: Verde/Rojo→Positivo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde→Negativo hLf



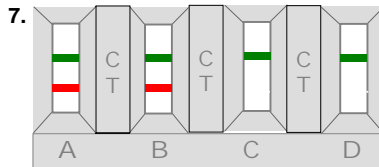
A: Verde/Rojo→Positivo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



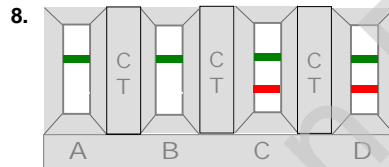
A: Verde/Rojo→Positivo Hhb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



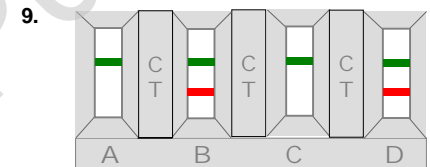
A: Verde→Negativo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



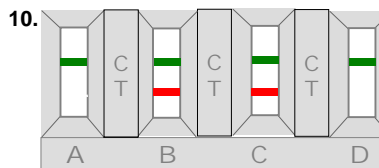
A: Verde/Rojo→Positivo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde→Negativo hLf



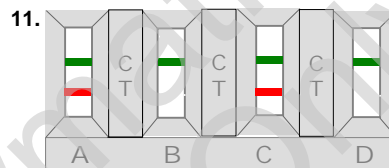
A: Verde→Negativo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



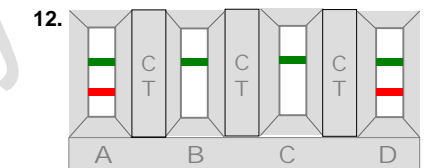
A: Verde→Negativo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



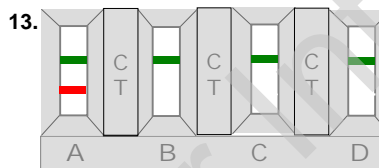
A: Verde→Negativo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde→Negativo hLf



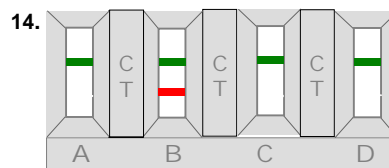
A: Verde/Rojo Positivo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde→Negativo hLf



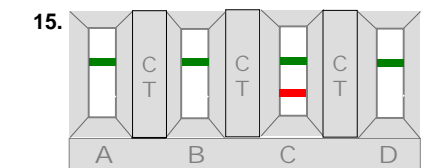
A: Verde/Rojo→Positivo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



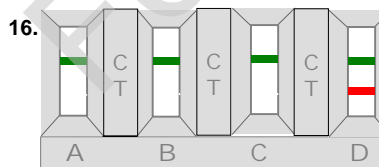
A: Verde/Rojo→Positivo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde→Negativo hLf



A: Verde→Negativo hHb
B: Verde/Rojo→Positivo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde→Negativo hLf



A: Verde→Negativo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde/Rojo→Positivo hCp
D: Verde→Negativo hLf



A: Verde→Negativo hHb
B: Verde→Negativo hTf
C: Verde→Negativo hCp
D: Verde/Rojo→Positivo hLf



CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

	A (hHb)	B (hTf)	C (hCp)	D (hLf)	Interpretación de los resultados
1.	-	-	-	-	No hay presencia de sangre oculta (ni hemoglobina, ni transferrina→no hay sangrado gastrointestinal). No hay un problema de inflamación gastrointestinal activa (ni calprotectina, ni lactoferrina).
	VERDE	VERDE	VERDE	VERDE	
2.	+	+	+	+	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina , lo que podría indicar un sangrado y una inflamación (enfermedad orgánica) gastrointestinal, cuya causa podría ser colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, algunos tipos de carcinoma (cáncer colorrectal), úlceras o infecciones bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC) o C. difficile</i>).
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
3.	+	+	+	-	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina, transferrina y calprotectina , lo que podría indicar sangrado e inflamación gastrointestinal causada por CD, UC o algún carcinoma (p.ej. cáncer colorrectal).
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE	
4.	+	+	-	+	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina, transferrina y lactoferrina , lo que podría indicar un sangrado y una inflamación gastrointestinal (orgánica) provocada por CD, UC o algún tipo de carcinoma (p.ej. cáncer colorrectal) y con una diarrea persistente: enteropatías bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC) o C. difficile</i>).
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE-ROJO	
5.	+	-	+	+	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina, calprotectina y lactoferrina , lo que podría indicar un sangrado e inflamación en la parte baja gastrointestinal provocada por CD, UC, algún carcinoma (p.ej. cáncer colorrectal) y si la diarrea es persistente: enteropatías bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC) o C. difficile</i>).
	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
6.	-	+	+	+	La muestra del paciente contiene los marcadores transferrina, calprotectina y lactoferrina , lo que podría indicar un sangrado e inflamación en la parte baja gastrointestinal causado por CD (no UC) o algún carcinoma (p.ej. cáncer gástrico) y si la diarrea es persistente: enteropatías bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC) o C. difficile</i>).
	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
7.	+	+	-	-	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina y transferrina lo que podría indicar problemas de sangrado gastrointestinal provocado por una infección bacteriana o algún carcinoma sin presencia de inflamación o algún tipo de trauma.
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE	
8.	-	-	+	+	La muestra del paciente contiene los marcadores calprotectina y lactoferrina , lo que podría indicar una inflamación orgánica gastrointestinal, cuyo origen podría ser colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, algunos tipos de carcinomas o enteropatías bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC), o C. difficile</i>).
	VERDE	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
9.	-	+	-	+	La muestra del paciente contiene los marcadores transferrina y lactoferrina , lo que podría indicar un sangrado e inflamación orgánica en la parte baja provocada por CD, algún carcinoma (p.ej. cáncer gástrico)
	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE-ROJO	
10.	-	+	+	-	La muestra del paciente contiene los marcadores transferrina y calprotectina , lo que podría indicar un sangrado e inflamación en la parte alta gastrointestinal causado por CD (no UC) o algún carcinoma (p.ej. cáncer colorrectal) y se la diarrea es persistente: enteropatías bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC) o C. difficile</i>).
	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE	
11.	+	-	+	-	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina y calprotectina , lo que podría indicar sangrado e inflamación orgánica en la parte baja del intestino causado por CD, UC o algún carcinoma (p.ej. cáncer colorrectal).
	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE	
12.	+	-	-	+	La muestra del paciente contiene los marcadores hemoglobina y lactoferrina , lo que podría indicar un sangrado e inflamación orgánica en la parte baja provocada por CD, UC o algún carcinoma (p.ej. cáncer colorrectal) y si la diarrea es persistente: enteropatías bacterianas (<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, E. coli (EIEC o EAEC) o C. difficile</i>).
	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE	VERDE-ROJO	
13.	+	-	-	-	La muestra del paciente contiene el marcador hemoglobina , lo que podría indicar que existe un sangrado en la parte baja del tracto gastrointestinal (p.ej. etapa inicial de cáncer colorrectal). La concentración de transferrina humana en sangre es 100 veces menos que la de hemoglobina. Poca cantidad de sangre en las heces.
	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE	VERDE	





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

14.	-	+	-	-	La muestra del paciente contiene el marcador transferrina , lo que podría indicar que existe un sangrado en la parte alta gastrointestinal (por ejemplo causado por un cáncer gástrico). No existe presencia de hemoglobina, probablemente degradada durante el tracto gastrointestinal
	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE	
15.	-	-	+	-	La muestra del paciente contiene el marcador calprotectina , lo que podría indicar presencia de inflamación gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, etc.), sin presencia de sangrado ni de cáncer colorrectal.
	VERDE	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE	
16.	-	-	-	+	La muestra del paciente contiene el marcador lactoferrina , lo que podría indicar presencia de inflamación gastrointestinal causada por una enteropatía de origen bacteriano, sin presencia de sangrado.
	VERDE	VERDE	VERDE	VERDE-ROJO	
17.	Cualquier otro resultado				Resultado Inválido: tanto en A, B, C o D, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

La aparición de cualquiera de los resultados del 2 al 16 de esta tabla, debe ser evaluado con otra prueba confirmatoria para determinar la causa exacta y el origen de los marcadores de sangre e inflamación aparecidos en la muestra del paciente.

INVÁLIDO: Cuando alguna de las líneas 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 revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la 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 hemoglobina, transferrina, 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 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 hemoglobina/transferrina/calprotectina/lactoferrina humana a débil cuando la concentración de hemoglobina/transferrina/calprotectin/lactoferrina humana está cerca del valor de cut-off del test.
- CerTest FOB+Transferrin+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, en hemoglobina y/o transferrina, determinan la presencia de hemoglobina y/o transferrina humana en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas, como hemorroides, sangre en orina, o irritaciones. Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para determinar la fuente y la causa de la presencia de sangre en la muestra de heces.
- Los resultados positivos, en calprotectina y/o lactoferrina, determinan la presencia de calprotectina y/o lactoferrina humana en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas (Enfermedad Inflamatoria Intestinal, cáncer colorrectal y algunas enteropatías). Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas invasivas diagnósticas, la colonoscopia y la biopsia son los métodos más adecuados para detectar y cuantificar la inflamación en el intestino.
- Un resultado negativo, en hemoglobina y/o transferrina, no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de hemoglobina y/o transferrina humanas en la muestra sea inferior a los valores de cut-off. Los resultados negativos, en hemoglobina y/o transferrina, no excluyen las hemorragias causadas por algunos pólipos ni el cáncer colorrectal, ya que pueden provocar hemorragias de forma intermitente o no provocarlas durante alguna fase de la enfermedad. Además, la sangre podría no haberse distribuido de manera uniforme en la muestra de heces.





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

8. Un resultado negativo, en calprotectina y/o lactoferrina, 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, en calprotectina y/o lactoferrina, no excluyen la presencia de inflamación, algunas enfermedades como la enfermedad celiaca y los pólipos microscópicos de colitis pueden presentar principalmente una inflamación mononuclear.
9. Heces de pacientes que sigan un tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) podrían dar resultados calprotectina positivos.
10. La lactoferrina es un componente de la leche materna, este test dará positivo en lactantes y no debería utilizarse para evaluar neonatos lactantes.
11. 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).
12. Las muestras de heces de pacientes que presenten una enfermedad inflamatoria intestinal que, suele llevar 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 ocasiones es mayor en la enfermedad de Crohn que en la colitis ulcerosa). CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin puede ser sensible para el diagnóstico en pacientes con diarrea crónica.
13. No se deben obtener muestras de pacientes durante su periodo menstrual, si presentan hemorroides sangrantes, sangre en orina, o estreñimiento.

VALORES ESPERADOS

El cáncer colorrectal afecta tanto a hombres como a mujeres pertenecientes a todos los grupos raciales, aunque con mayor incidencia en personas a partir de los 50 años y en ancianos. En los hombres, supone la tercera causa más común de cáncer tras el de próstata y pulmón. En las mujeres, el cáncer colorrectal es la tercera causa de cáncer tras el de mama y pulmón.

En varios estudios se ha determinado que el valor de cut-off de hemoglobina sea igual o superior a 5.1µgHb/g heces y de transferrina igual o superior a 0.4µgTf/g heces para permitir detectar pacientes adultos con sangrado gastrointestinal que requerirán para su diagnóstico un procedimiento adicional invasivo.

En varios estudios se ha determinado que el valor de cut-off de calprotectina sea igual o superior a 50µg/g heces y de lactoferrina igual o superior a 10µg/g heces, para permitir detectar pacientes adultos con una patología inflamatoria gastrointestinal que requerirán para su diagnóstico un procedimiento adicional invasivo.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica (Tira A y B)

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin, CerTest) y otros tests comercializados (ImmunoTech OcculTech, YD Diagnostics, y Human Hexagon, OBTI). Los resultados se muestran a continuación:

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Hemoglobina)		IC test: ImmunoTech OcculTech		
		+	-	Total
+		10	0	10
-		0	10	10
	Total	10	10	20

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest FOB+Transferrin+ Calprotectin+Lactoferrin (Hemoglobina) vs. ImmunoTech OcculTech	>99%	>99%	>99%	>99%





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin (Transferrina)	IC test: Human Hexagon			
		+	-	Total
	+	10	0	10
-	0	14	14	
Total	10	14	24	

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest FOB+Transferrin+ Calprotectin+Lactoferrin (Transferrin) vs. Human Hexagon	>99%	>99%	>99%	>99%

Sensibilidad y especificidad clínica (Tira C y D)

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin, CerTest), otro inmunoensayo comercial (Calprest®, Eurospital) para calprotectin y otro inmunoensayo comercial (IBD EZ VUE®, TechLab®) para lactoferrin. Los resultados se muestran a continuación:

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

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

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

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

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





CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

Reacciones cruzadas

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

- Tira de hemoglobina humana no hay reacción cruzada con:

Transferrina humana	Lactoferrina humana
Calprotectina humana	Transferrina humana
- Tira de transferrina humana no hay reacción cruzada con:

Calprotectina humana	Hemoglobina humana
Hemoglobina bovina y de cerdo	Lactoferrina humana

No se recomienda ninguna dieta especial antes de la prueba. No hay interferencias con ningún alimento (vitamina C, brócoli, zanahorias...).

- Tira de calprotectina humana no hay reacción cruzada con:

Hemoglobina bovina y de cerdo	Lactoferrina humana
Hemoglobina humana	Transferrina bovina y de cerdo
Lactoferrina bovina	Transferrina humana
- Tira de lactoferrina humana no hay reacción cruzada con:

Calprotectina humana	Lactoferrina bovina
Hemoglobina bovina y de cerdo	Transferrina bovina y de cerdo
Hemoglobina humana	Transferrina humana














CERTEST FOB+Transferrin+Calprotectin+Lactoferrin

One Step test to detect human haemoglobin, human transferrin, human calprotectin and human lactoferrin combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de hemoglobina, transferrina, calprotectina y lactoferrina humanas en formato cassette

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. Towler BP, Irwig L, Glasziou P, Weller D, Kewenter J. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. Cochrane Database Syst Rev. 2000;(2): CD001216.
2. Ransohoff DF and Lang CA. Screening for colorectal cancer with the Fecal Occult Blood Test: a background paper. Ann Intern Med. 1997; 126: 811-822.
3. Ransohoff DF and Lang CA. Suggested technique for Faecal Occult Blood testing and interpretation in colorectal cancer screening. Ann Intern Med. 1997; 126: 808-810.
4. Chien-Hua Chiang et al., "A Comparative Study of Three Fecal Occult Blood Test in Upper Gastrointestinal Bleeding". Kaohsiung J. Med. Sci. May 2006, 22; 223-228.
5. Virtanen et al., "Higher concentrations of serum transferrin receptor in children than in adults", Am. J. Clin. Nutr. 1999; 69: 256-60.
6. Angriman I. et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. Clinica Chimica Acta 381 Feb 2007, p. 63-68.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

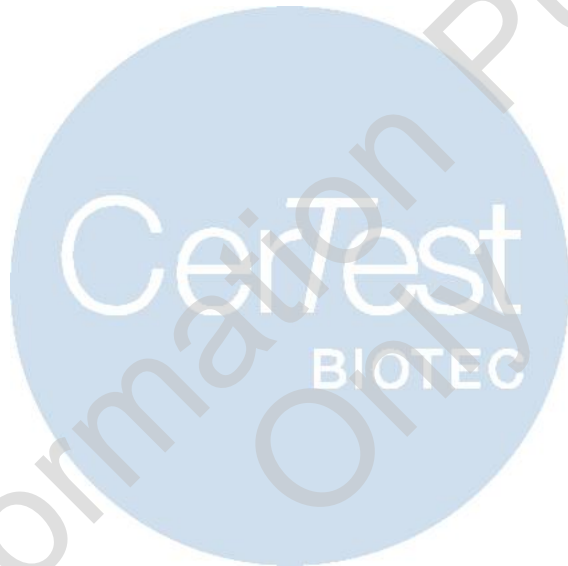
 IVD <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 LOT Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL Sample diluent Diluyente de muestra	 REF Catalogue number Número de referencia



For Information Only



For Information Only Purposes



CerTest
BIOTEC S.L.

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

