



# BÜHLMANN fCAL<sup>®</sup> ELISA

## Calprotectina ELISA

Para uso em diagnósticos *in vitro*

EK-CAL 96 tests

EK-CAL2 192 tests

Data de lançamento: 2022-11-16

Versão A3

---

 **Fabricante**

**BÜHLMANN Laboratories AG**

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Suíça

Tel.: +41 61 487 12 12

Fax: +41 61 487 12 34

info@buhlmannlabs.ch

# PORTUGUÊS

## USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN fCAL® ELISA é um teste de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa de calprotectina em amostras fecais humanas, para uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do teste podem ser usados como um auxiliar de diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DIIs; mais especificamente doença de Crohn ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7) em pacientes com dor abdominal crônica e também como auxiliar no monitoramento das DIIs (ref. 7-18).

Somente para uso laboratorial.

## PRINCÍPIO DO ENSAIO

O BÜHLMANN fCAL® ELISA permite a medição seletiva da calprotectina em extratos fecais através do método ELISA Sandwich. A placa de microtitulação do BÜHLMANN fCAL® ELISA é revestida com um anticorpo monoclonal de captura (mAb) altamente específico para os complexos heterodiméricos e poliméricos da calprotectina. Os extratos das amostras fecais dos pacientes, os controles para determinação da aceitabilidade da corrida do ELISA e os calibradores são carregados nos poços da placa de microtitulação. Depois de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e de etapas de lavagem, um anticorpo de detecção (Ab) conjugado a uma peroxidase de raiz forte (HRP) detecta as moléculas de calprotectina ligadas ao anticorpo de captura na placa. Depois da incubação e de etapas adicionais de lavagem, o substrato cromogênico de HRP tetrametilbenzidina (TMB) é adicionada (formação da cor azul), seguida de uma solução de interrupção (mudança para a cor amarela). A absorção é medida a 450 nm. A concentração final da calprotectina (µg/g) nas amostras fecais dos pacientes é determinada usando-se a curva de calibração gerada a partir dos valores medidos dos calibradores

## REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade		Código	Reconstituição
	EK-CAL	EK-CAL2		
<b>Tampão de extração</b>	3 frascos x 125 mL	6 frascos x 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para utilização
<b>Placa de microtitulação</b> pré-revestida com mAb anticalprotectina	12 tiras x 8 poços com suporte	2 x 12 tiras x 8 poços com suporte	B-CAL-MP	Pronto para utilização
<b>Selador da placa</b>	3 unidades	6 unidades	-	Pronto para utilização
<b>Concentrado do tampão de lavagem (10x)</b> com conservantes	1 frasco x 100 mL	2 frascos x 100 mL	B-CAL-WB	Diluir cada um com 900 mL de água deionizada.

Reagentes	Quantidade		Código	Reconstituição
	EK-CAL	EK-CAL2		
<b>Tampão de incubação</b> com conservantes	2 frascos x 125 mL	3 frascos x 125 mL	B-CAL-IB	Pronto para utilização
<b>Calibradores A a E<sup>1) 2)</sup></b> Calprotectina derivada de soro em matriz-tampão com conservantes	5 frascos x 1 mL	5 frascos x 1 mL	B-CAL-CASET	Pronto para utilização
<b>Controle alto / baixo<sup>3)</sup></b> Calprotectina derivada de soro em matriz-tampão com conservantes	2 frascos x 1 mL	2 frascos x 1 mL	B-CAL-CONSET	Pronto para utilização
<b>Marcador enzimático</b> Ab anticalprotectina conjugado a HRP	1 frasco x 12 mL	2 frascos x 12 mL	B-CAL-EL	Pronto para utilização
<b>Substrato de TMB</b> TMB em tampão de citrato	1 frasco x 12 mL	2 frascos x 12 mL	B-TMB12	Pronto para utilização
<b>Solução de parada</b> Ácido sulfúrico 0,25 M	1 frasco x 12 mL	2 frascos x 12 mL	B-ST512	Pronto para utilização <b>Agente corrosivo</b>

Tabela 1

<sup>1)</sup> A concentração real de calprotectina nos calibradores A a E é de 4, 12, 40, 120 e 240 ng/mL, respectivamente. Para o procedimento ELISA de faixa mais baixa, os valores dos calibradores devem ser ajustados como se segue: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina. Esta atribuição corresponde à diluição final da amostra de 1:2500 no procedimento ELISA de faixa mais baixa.

<sup>2)</sup> Para o procedimento ELISA de faixa estendida, os valores nominais dos calibradores devem ser ajustados como se segue: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina. Esta atribuição corresponde à diluição final da amostra de 1:7500 no procedimento ELISA de faixa estendida.

<sup>3)</sup> Os controles contêm quantidades de calprotectina humana nativa específicas a cada lote. Consulte a folha de dados de CQ adicional para obter as concentrações reais.

## ARMAZENAMENTO PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes selados / não abertos	
Guarde a uma temperatura na faixa de 2–8 °C. Não use os reagentes depois da data de validade impressa nos rótulos.	
Reagentes abertos / reconstituídos	
Tampão de extração	Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C.
Placa de microtitulação	Retorne imediatamente as tiras não usadas para a embalagem aluminizada contendo os sachês de dessecante e torne a selar ao longo de toda a borda do fecho tipo zip. Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C.
Tampão de lavagem diluído	Guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2–8 °C.
Tampão de incubação	
Calibradores	
Controles	
Marcador enzimático	
Substrato de TMB	
Solução de parada	

Tabela 2

## REAGENTES E MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

### Dispositivos de extração fecal

Os dispositivos de extração fecal descritos na tabela 3 não são fornecidos com o kit. Os dispositivos de extração selecionados devem ser pedidos separadamente.

Kits de dispositivos de extração	Quantidade	Código
CALEX® Cap	Pacotes de 50, 200 ou 500 tubos disponíveis, cada um preenchido com 5 mL de tampão de extração. Pronto para utilização	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos, espátulas e tampas de base	B-CAL-RD

Tabela 3

## MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM NÃO FORNECIDOS

### Procedimento de extração

- Pipetas de precisão de 100 µL e 1000 µL com ponteiros descartáveis.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a transferência de extratos (opcional).
- Estação de trabalho de fluxo laminar.
- Misturador tipo vórtex multitubo / misturador tipo vórtex
- Microcentrífuga (≥3000 g)
- Centrífuga (≥500 g)
- Dispositivos de extração (consulte a tabela 3 acima) ou, para o procedimento de extração manual:
  - Alças de inoculação descartáveis de 10 µL
  - Tubos de polipropileno de 15 mL com tampas rosqueadas são necessários
  - Balança de precisão (10–200 mg)

### Procedimento ELISA

- Pipetas de precisão de 10 µL, 100 µL e 1000 µL com ponteiros descartáveis.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para a preparação de diluições de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para a diluição do tampão de lavagem.
- Lavador automático para a placa de microtitulação (verifique as precauções técnicas) ou pisseta para o tampão de lavagem.
- Agitador para a placa de microtitulação (verifique as precauções técnicas)
- Papel mata-borrão
- Leitor de placa de microtitulação para medição da absorbância a 450 nm.

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

### Precauções de segurança

- Os calibradores e controles deste teste contêm componentes de origem humana. Embora testados negativos para o antígeno de superfície do HBV, anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções, sempre de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPL) e usando-se as precauções apropriadas.
- Este kit contém componentes classificados de acordo com a Regulamentação (CE) n.o 1272/2008: cloridrato de 2-metil-4-isotioiazolin-3-ona (≥ 0,0015%); portanto, os reagentes podem provocar reações alérgicas na pele (H317). Ácido sulfúrico (conc. ≥ 2,5 - < 5%); portanto, os reagentes podem provocar irritação da pele (H315) e irritação ocular grave (H319).
- Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com quantidades abundantes de água; caso contrário poderá ocorrer irritação/queimaduras.
- Os reagentes e compostos químicos devem ser tratados como resíduos perigosos, em conformidade com as diretrizes ou regulamentações nacionais de segurança de riscos biológicos.

### Precauções técnicas

#### Componentes do kit

- Os resíduos nos poços da placa de microtitulação resultam do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento do ensaio) e não afetam os resultados.
- Os componentes não devem ser usados depois da data de validade impressa nos rótulos.
- Não misture ou utilize componentes de kits com diferentes números de lotes.
- Todas as providências devem ser tomadas para assegurar que não ocorra contaminação cruzada entre os reagentes, amostras ou entre poços.
- Deixe os reagentes atingirem equilíbrio à temperatura ambiente. Misture bem os reagentes (vórtex) antes de usar.
- Os micropoços não podem ser reutilizados.

#### Procedimento de extração manual

- Para obter resultados quantitativos, é importante homogeneizar completamente a amostra fecal adicionada ao tampão de extração. Devem-se evitar contaminações na parte superior do tubo de extração. Uma pequena quantidade de partículas insolúveis poderá permanecer depois da mistura.

#### Procedimento ELISA

- No procedimento do ELISA, as etapas de lavagem são essenciais para garantir resultados reproduzíveis. Deixe o tampão de lavagem incubar nos poços por pelo menos 20 segundos antes de retirar.

- Se um lavador automático estiver sendo usado, recomenda-se enfaticamente empregar o “modo de placa”, i.e., cada etapa do processo (distribuição / aspiração) é executada em todas as tiras sequencialmente, antes que o instrumento passe para o próximo ciclo de lavagem. Dessa forma, o tempo mínimo de incubação é garantido.
- O número indicado de ciclos de lavagem é essencial para assegurar a obtenção de resultados reproduzíveis.
- O agitador da placa deve ser ajustado para aproximadamente 450 rpm (7,5 Hz). Uma frequência de rotação mais elevada pode levar a uma linearidade de diluição deficiente a valores entre 300/900 e 600/1800 µg/g. Deve-se usar um movimento rotacional em vez de horizontal.
- Para assegurar que a reação antígeno/anticorpo seja completa, o tempo de incubação na etapa 5 deve ser de pelo menos 30 minutos. Períodos de incubação moderadamente mais longos (até 5 minutos a mais) não influenciam o resultado final.
- O marcador enzimático é desativado por oxigênio e é altamente sensível a azida de sódio, timerosal, ácido hipocloroso e hidrocarbonetos clorados aromáticos normalmente encontrados no suprimentos de água de laboratório. Assim, utilize somente água deionizada de alta qualidade.
- Uma nova curva padrão deverá ser gerada sempre que um novo teste for realizado (para cada placa ou placa parcial).
- Se a concentração inicial de uma amostra desconhecida indicar uma leitura acima da concentração do maior calibrador (E), a amostra deverá ser adicionalmente diluída com o tampão de incubação e testada novamente de acordo com o procedimento de teste. O fator de diluição total resultante deverá ser levado em conta no cálculo dos resultados.

## COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Para o procedimento de extração, menos de 1 g da amostra nativa de fezes será necessário. Colete as amostras de fezes em tubos comuns.

Importante: A amostra deve ser coletada sem nenhum aditivo químico ou biológico.

### Transporte das amostras

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório para processamento até 3 dias depois da coleta. Elas devem ser transportadas à temperatura ambiente ou refrigeradas.

### Armazenamento das amostras

As amostras de fezes devem ser armazenadas a uma temperatura na faixa de 2-8 °C e extraídas até 3 dias depois de recebidas no laboratório. Não guarde amostras a temperaturas elevadas.

## EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES E ESTABILIDADE DOS EXTRATOS

### 1. CALEX® Cap

#### 1.1 Procedimento de extração

Siga as instruções de uso fornecidas com o dispositivo CALEX® Cap (Código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Dispositivo CALEX® Cap: As amostras líquidas de fezes podem ser pipetadas diretamente no dispositivo CALEX® Cap. Desenrosque a tampa azul e pipete 10 µL da amostra de fezes no dispositivo. Recoloque a tampa no dispositivo CALEX® Cap e proceda com a etapa de mistura por vórtex de acordo com o procedimento de extração descrito e ilustrado nas instruções de uso fornecidas com o dispositivo CALEX® Cap.

Importante: Centrifugue o dispositivo CALEX® Cap por 5 minutos a 500 - 3000x g antes de executar o procedimento.

#### 1.2 Estabilidade dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o CALEX® Cap permanecem estáveis à temperatura ambiente (23 °C) por 7 dias e, na faixa de temperatura de 2–8 °C, por até 15 dias. Para armazenar por períodos de tempo mais longos, congele os extratos a -20 °C. Os extratos congelados se mantêm estáveis por um período de até 23 meses.

Os extratos do CALEX® Cap podem ser congelados diretamente e armazenados dentro do dispositivo CALEX® Cap. Os extratos podem ser submetidos a até quatro ciclos de congelamento-descongelamento. Antes da medição, deixe os extratos congelados atingirem o equilíbrio à temperatura ambiente, misture bem por agitação vórtex por 10 segundos e então centrifugue por 5 minutos a 500–3000 g.

## 2. Outros dispositivos de extração

### 2.1 Procedimentos de extração

Siga as instruções de uso fornecidas com o dispositivo de extração usado:

- Dispositivo de extração fecal Roche (Código 10745804322) ou BÜHLMANN Smart-Prep (Código: B-CAL-RD).

Importante: Depois da extração com o BÜHLMANN Smart-Prep, centrifugue os tubos por 5 minutos a 3000 g. Opcionalmente, transfira o homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue em uma microcentrifuga por 5 minutos a 3000 g. Decante o sobrenadante em um tubo novo rotulado e dê continuidade ao procedimento de teste.

### 2.2 Estabilidade dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o Smart-Prep permanecem estáveis a 2–8 °C por até 7 dias, inclusive, ou a -20 °C por até 36 meses.

## 3. Extração manual

### 3.1 Procedimento de extração

1. Rotule e pese o tubo de polipropileno vazio, incluindo a alça de inoculação. Registre o peso (tara).
2. Colete de 50 a 100 mg da amostra de fezes usando a alça de inoculação e coloque no tubo pré-pesado, pesando-o novamente em seguida (peso bruto). Evite recolher fibras dietéticas presentes na amostra durante o processo de amostragem.

3. Calcule a quantidade líquida da amostra subtraindo a tara do peso bruto, desconecte a alça de inoculação e deixe a parte inferior da alça no tubo.
4. Adicione tampão de extração ao tubo de acordo com a fórmula  
 $x \text{ mg fezes} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L de tampão de extração}$  (p. ex., 50 mg de fezes + 2450  $\mu\text{L}$  de tampão) e feche o tubo.
5. Extraia as amostras da seguinte maneira:
  - Agite vigorosamente o tubo de extração que contém o tampão e a amostra de fezes usando um misturador tipo vórtex (multitubo) à velocidade mais alta por 30 segundos.
  - Em seguida, incube o tubo de extração por  $25 \pm 5$  minutos em um agitador de placas a aproximadamente 400 rpm. A alça de inoculação no interior do tubo ajuda a acentuar o efeito da agitação.
  - Mais uma vez, agite vigorosamente o tubo de extração por vórtex por 30 segundos.
6. Transfira 1,5 mL do homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue em uma microcentrífuga por 5 minutos a 3000 g.
7. Decante o sobrenadante em um tubo rotulado novo e dê continuidade ao procedimento de teste, ou então armazene os extratos (consulte a seção sobre o armazenamento de extratos).

### 3.2 Estabilidade dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos por extração manual podem ser armazenados a 2–8 °C por até 7 dias, inclusive, ou a -20 °C por até 36 meses.

## FAIXA DE TRABALHO

Este ensaio pode ser realizado de acordo com os procedimentos a seguir: procedimento ELISA de faixa mais baixa ou estendida. O procedimento apropriado deve ser selecionado de acordo com a concentração de calprotectina esperada:

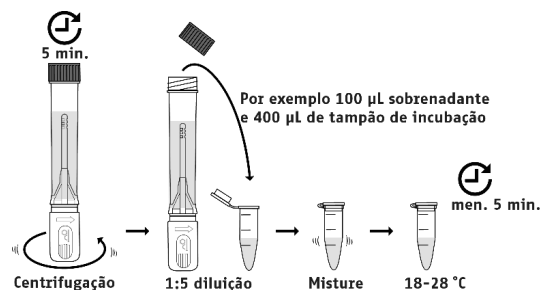
- Para amostras até 600  $\mu\text{g/g}$  de calprotectina, selecione o procedimento de faixa mais baixa (faixa de trabalho de 10–600  $\mu\text{g/g}$ ).
- Se as amostras tenderem a ultrapassar 600  $\mu\text{g/g}$ , selecione o procedimento de faixa estendida (faixa de trabalho de 30–1800  $\mu\text{g/g}$ ).

## PROCEDIMENTO

**Importante:** Deixe todos os reagentes atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 30 minutos antes de usar. Somente dilua os extratos fecais. Os calibradores e controles estão prontos para utilização.

### 1. Opção de diluição de amostra 1: Faixa de trabalho de 10–600 $\mu\text{g/g}$

- 1.1. **Dispositivo CALEX® Cap:** Dilua os extratos fecais a 1:5 usando o tampão de incubação (p. ex., 100  $\mu\text{L}$  de extrato e 400  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.



- 1.2 **Extração manual ou Smart-Prep:** Dilua os extratos fecais a 1:50 usando o tampão de incubação (p. ex., 20  $\mu\text{L}$  de extrato e 980  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.

### 1. Opção de diluição de amostra 2: Faixa de trabalho de 30–1800 $\mu\text{g/g}$

A faixa de trabalho pode ser estendida em um fator de 3 se as amostras forem diluídas a 1:7500 em vez de 1:2500. Este procedimento é recomendado se forem esperadas concentrações elevadas de calprotectina.

- 1.1' **Dispositivo CALEX® Cap:** Dilua os extratos fecais a 1:15 usando o tampão de incubação (p. ex., 50  $\mu\text{L}$  de extrato e 700  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.



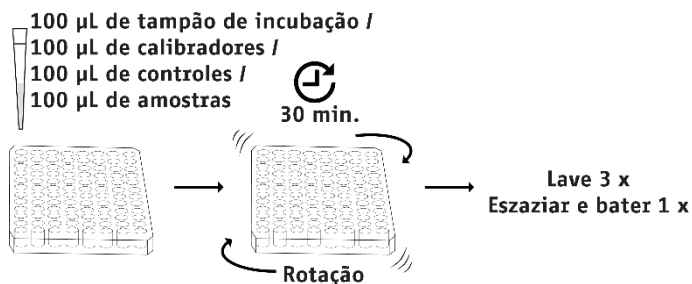
- 1.2' **Extração manual ou Smart-Prep:** Dilua os extratos fecais a 1:150 usando o tampão de incubação (p. ex., 20  $\mu\text{L}$  de extrato e 2980  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras atingirem o equilíbrio a 18–28 °C por pelo menos 5 minutos antes de passar para a etapa 4c.

2. Prepare um suporte de placa com tiras suficientes para testar a quantidade requerida de calibradores, controles e amostras diluídas. Remova o excesso de tiras do suporte e torne a selá-las sem demora na embalagem aluminizada, juntamente com os sachês de dessecante. Mantenha sob refrigeração.
3. Lave os poços revestidos duas vezes, usando pelo menos 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

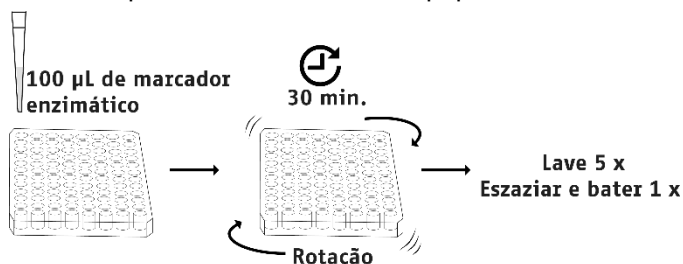
**Importante:** Deixe o tampão de lavagem nos poços por pelo menos 20 segundos durante cada etapa de lavagem.



- 4a. Pipete 100 µL do tampão de incubação (branco), e Pipete 100 µL dos calibradores A – E nos respectivos poços.
- 4b. Pipete 100 µL dos controles baixo e alto nos respectivos poços.
- 4c. Pipete 100 µL de cada amostra diluída nos poços subsequentes.
5. Cubra a placa com um selador e incube por 30 + 5 min (máx.) em um agitador de placas ajustado para ~ 450 rpm a 18–28 °C (consulte as Precauções técnicas – Procedimento ELISA).
6. Remova e descarte o selador da placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço (consulte as Precauções técnicas – Procedimento ELISA). Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

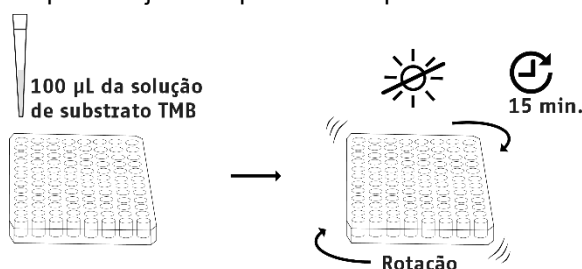


7. Adicione 100 µL do marcador enzimático em todos os poços.
8. Cubra a placa com um selador e incube por 30 ± 5 min em um agitador de placas ajustado para ~ 450 rpm a 18–28 °C.
9. Remova e descarte o selador da placa. Esvazie os poços e lave cinco vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa com firmeza sobre papel mata-borrão.

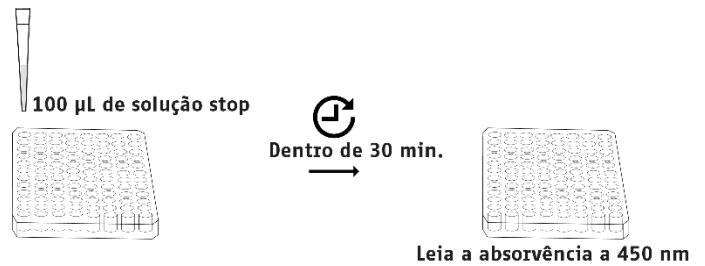


**Importante:** Deixe a solução do substrato de TMB atingir o equilíbrio a 18–28 °C.

10. Pipete 100 µL da solução do substrato de TMB em todos os poços.
11. Cubra a placa com um selador, proteja a placa contra luz direta e incube por 15 ± 2 min em um agitador de placas ajustado para ~ 450 rpm a 18–28 °C.



12. Pipete 100 µL da solução de parada em todos os poços. Remova bolhas de ar com a ponta de uma pipeta. Execute a etapa 13 dentro de até 30 minutos.
13. Leia a absorvância a 450 nm em um leitor de placa de microtitulação.



## CONTROLE DE QUALIDADE

Para que se possa utilizar o produto com sucesso, é necessário compreender bem estas instruções de uso. Somente serão obtidos resultados confiáveis se técnicas laboratoriais precisas forem empregadas, seguindo-se estas instruções de uso à risca.

O kit BÜHLMANN fCAL® ELISA é fornecido com dois controles: alto e baixo. Os valores de referência correspondentes dos controles estão indicados na folha de dados de CQ fornecida com cada kit. Os valores e faixas indicados na folha de dados de CQ sempre se referem ao lote do kit em questão e devem ser usados para comparação direta dos resultados. Se os resultados dos controles baixo e/ou alto ficarem fora da faixa indicada na folha de dados de CQ, recomenda-se considerar toda a corrida como inválida.

Recomenda-se também usar as amostras de controle em adição aos controles do kit, de acordo com as regulamentações locais e nacionais. O uso de amostras de controle interno é recomendado para assegurar a validação diária dos resultados. Uma vez que não existe controle comercialmente disponível para calprotectina fecal, sugerimos utilizar um pool de extratos fecais com níveis normais e patológicos como controle de qualidade interno.

A reprodutibilidade de parâmetros da curva padrão e dos valores de controle deve se manter dentro dos limites estabelecidos da aceitabilidade do laboratório. Se o desempenho do ensaio não atender aos limites estabelecidos e a repetição excluir erros de técnica, verifique os seguintes pontos: i) pipetagem, controle de temperatura e dispositivos de cronometragem; ii) os ajustes do leitor ELISA; iii) as datas de validade dos reagentes; iv) as condições de armazenamento e incubação; v) a solução do substrato de TMB (que deve ser incolor); vi) a pureza da água; e, vii) os métodos de aspiração e lavagem.

## PADRONIZAÇÃO E RASTREABILIDADE METROLÓGICA

Não existem materiais de referência ou procedimentos de medição de referência reconhecidos internacional ou nacionalmente para o analito calprotectina em amostras de fezes. Os valores dos calibradores do BÜHLMANN fCAL® ELISA são determinados em corridas de medições múltiplas usando-se material de referência interno com base em soro humano, e no procedimento de medição do BÜHLMANN fCAL® ELISA. A

concentração de calprotectina do material de referência interno foi determinada usando-se MRP8/14 purificado de granulócitos humanos como material de referência primário.

O intervalo de confiança de 95% da incerteza combinada dos calibradores do produto foi determinado como inferior a 13,3%, enquanto a incerteza combinada dos controles do produto ficou abaixo de 16,4%.

## CÁLCULOS E RESULTADOS

### Curva padrão

Recomenda-se usar um programa de software capaz de executar os seguintes cálculos: subtrair o valor da densidade óptica (DO) dos brancos de cada poço de calibrador para calcular o valor do calibrador. Gerar uma curva padrão usando ajuste por regressão logística de 4 parâmetros (4 PL).

### Controles e amostras

Recomenda-se usar um programa de software capaz de executar os seguintes cálculos: subtrair o valor da densidade óptica (DO) dos brancos de cada poço de controle/amostra. Calcular a concentração de calprotectina do controle/amostra em cada poço, em µg/g, usando a curva padrão gerada.

### Faixa de trabalho de 10–600 µg/g

Se o procedimento ELISA de faixa mais baixa for selecionado, as concentrações dos calibradores deverão ser ajustadas como se segue: 10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina. Fatores de diluição adicionais (caso se esteja usando uma diluição final diferente de 1:2500) devem ser multiplicados pelos resultados para se obter os resultados finais.

Consulte a tabela 12 e a figura 1 para verificar dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e a curva padrão são fornecidos somente a título de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a ser analisado.

### Faixa de trabalho de 30–1800 µg/g

Se o procedimento ELISA de faixa estendida for selecionado, os valores nominais de calibradores a seguir devem ser ajustados como se segue: 30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina. Fatores de diluição adicionais (caso se esteja usando uma diluição final diferente de 1:7500) devem ser multiplicados pelos resultados para se obter os resultados finais.

Consulte a tabela 15 e a figura 3 para verificar dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e a curva padrão são fornecidos somente a título de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a ser analisado.

## LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit BÜHLMANN fCAL® ELISA se destinam somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras de fezes humanas.
- Os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica do paciente e de outros procedimentos de diagnóstico.

- Para o monitoramento de DII, sugeriu-se que diversas medições da calprotectina fecal realizadas em intervalos de até 4 semanas possibilitam melhor precisão de diagnóstico na previsão da recidiva clínica em pacientes (ref. 19-20).
- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) poderão apresentar aumentos nos níveis de calprotectina fecal.
- Os resultados podem não ser clinicamente aplicáveis a crianças menores de 4 anos de idade que tenham níveis de calprotectina fecais levemente aumentados (ref. 21-24).

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### I. Como distinguir doenças gastrointestinais orgânicas de funcionais

As categorias de resultados baseiam-se nos dados de estudos clínicos realizados pela BÜHLMANN e são recomendações da BÜHLMANN. Todos os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis dos sintomas clínicos do paciente, seu histórico médico e outros resultados clínicos e laboratoriais.

#### Limiar clínico

Os resultados de 58 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com SII e de 131 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com DIIs (provenientes de um estudo clínico internacional) foram analisadas para se obter os valores descritos na tabela 4.

Concentração de calprotectina	Interpretação	Acompanhamento
< 80 µg/g	Normal	Nenhum
80 – 160 µg/g	Zona cinzenta/limítrofe	Retorno dentro de 4-6 semanas
> 160 µg/g	Elevada	Repetir conforme necessário

Tabela 4

#### Valores de calprotectina abaixo de 80 µg/g

Valores de calprotectina fecal abaixo de 80 µg/g não são indicativos de inflamação do trato gastrointestinal. Os pacientes com baixos níveis de calprotectina fecal provavelmente não requerem procedimentos invasivos para determinação da causa da inflamação.

#### Valores de calprotectina entre 80 e 160 µg/g

Os níveis intermediários de calprotectina (entre 80 e 160 µg/g, inclusive), também conhecidos como níveis da zona cinzenta, não são diretamente indicativos de inflamação ativa que necessite de acompanhamento imediato com testes invasivos. Todavia, a presença de inflamação não pode ser descartada. A reavaliação dos níveis de calprotectina fecal depois de 4 a 6 semanas é recomendada para determinação do status inflamatório.

#### Valores de calprotectina maiores que 160 µg/g

Valores de calprotectina acima de 160 µg/g são indicativos de infiltrado de neutrófilos no trato gastrointestinal e, portanto, podem significar a presença de doença inflamatória ativa. Sugere-se a execução de procedimentos de investigação adicionais apropriados, conduzidos por especialistas, para se obter um diagnóstico clínico completo.

## **Avaliação clínica**

A capacidade do BÜHLMANN fCAL® ELISA de fazer a distinção entre pacientes com DIIs e outros distúrbios não inflamatórios gastrointestinais, incluindo a SII, foi testada em um estudo clínico com um total de 337 pacientes adultos e pediátricos. Cento e trinta e cinco (135) pacientes apresentaram um diagnóstico final de DIIs (doença de Crohn, colite ulcerativa ou colite indeterminada), 130 pacientes sofriam de SII e 72 apresentavam dor abdominal e/ou diarreia ou outras condições não inflamatórias associadas ao trato gastrointestinal (GI) (consulte a tabela 5). O diagnóstico final foi corroborado por resultados endoscópicos e outros resultados clínicos.

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 83,7% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e condições não inflamatórias associadas ao trato GI, incluindo a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,923 (consulte a tabela 6).

Uma sensibilidade clínica de 93,3% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 85,4% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,933 (consulte a tabela 8).

A combinação ótima de ponto de corte para esses grupos de pacientes pôde ser definida por análise de ROC a 80 µg/g e 160 µg/g de calprotectina, valores ligeiramente mais restritivos que uma combinação de um ponto de corte inferior **mais sensível de 50 µg/g** com um desempenho mais baixo em especificidade, e um ponto de corte superior de **200 µg/g, com uma sensibilidade ligeiramente mais baixa** (tabelas 7 e 9).

## **II. Monitoramento de DII**

### **Limiares e avaliação clínica**

A determinação da calprotectina fecal também é uma forma confiável e simples de auxiliar no monitoramento de pacientes com DII (ref. 7-18).

A correlação entre os níveis de calprotectina e o status inflamatório da mucosa intestinal do paciente, de acordo com avaliações endoscópicas, foi determinada em três estudos independentes usando testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 10). Determinou-se o valor do diagnóstico da calprotectina na predição da remissão e recidiva clínicas em três estudos usando-se testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 11), de acordo com os sintomas dos pacientes, os índices de atividade clínica, e a necessidade não planejada de intensificação de terapia, hospitalização ou emergência.

As categorias de resultados mostradas são recomendações e sua determinação se baseia no conhecimento condensado de valores de corte e estudos de desempenho clínico publicados. Aconselha-se que os profissionais de saúde definam limiares individuais para cada paciente a partir da determinação do nível de base de calprotectina durante a remissão da doença.

### **Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g:**

Níveis de calprotectina fecal abaixo de 100 µg/g podem indicar confiavelmente pacientes com baixo risco de recidiva clínica que estão em remissão endoscópica e para os quais procedimentos endoscópicos invasivos podem ser evitados (ref. 7-18).

### **Valores de calprotectina entre 100 e 300 µg/g**

Níveis de calprotectina fecal entre 100 e 300 µg/g podem indicar a necessidade de um controle mais rigoroso no período seguinte para avaliar as tendências de desenvolvimento da doença.

### **Valores de calprotectina acima de 300 µg/g**

Níveis de calprotectina fecal acima de 300 µg/g requerem a repetição do teste e, se confirmados os níveis elevados, indicam a necessidade execução de procedimentos adicionais de investigação (ref. 7-18).

---

## **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**

As características de desempenho do BÜHLMANN fCAL® ELISA foram estabelecidas usando-se o método de extração manual, exceto se indicado de outra forma.

### **Faixa de trabalho: 10–600 µg/g**

#### **Repetibilidade (precisão intraensaio):**

**1,9 - 8,0% do CV**

#### **Precisão intralaboratorial: 5,5 - 14,0% do CV**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas com base na diretriz EP05-A2 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 22 dias x 2 replicatas. Foram testados dez extratos de amostras fecais com concentrações de calprotectina na faixa de 13,2 – 501,4 µg/g (tabela 13).

#### **Limite de detecção (LoD): 4,2 µg/g**

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A do CLSI, com proporções de falsos positivos ( $\alpha$ ) inferiores a 5% e de falsos negativos ( $\beta$ ) inferiores a 5%, com base em 240 determinações com 80 brancos (tampão de extração) e 160 replicatas de baixo nível; e um **LoB de 0,29 µg/g**. Uma função paramétrica cúbica foi usada para extrapolar os valores de DO das amostras de branco para concentrações de calprotectina em µg/g.

#### **Limite de quantificação (LoQ): 9,8 µg/g**

O LoQ foi estabelecido usando-se dados obtidos no estudo de precisão intralaboratorial, incluindo uma amostra fecal adicional com uma concentração de 7,4 µg/g. O LoQ foi determinado como a concentração de calprotectina na qual o ajuste não linear dos dados de precisão total intersecta a meta de precisão de 20% do CV.

#### **Linearidade: 10–600 µg/g**

A faixa linear do BÜHLMANN fCAL® ELISA foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Um desvio máximo de  $\pm 20\%$  da linearidade foi permitido. Para valores abaixo de 75 µg/g, uma diferença absoluta inferior a  $\pm 15\%$  µg/g foi permitida (tabela 14).

#### **Precisão / recuperação**

**Desvio total: -1,1%;**

**Limite inferior de Concordância: -17,5%,**

**Limite superior de concordância: 15,4%**

Quatro amostras fecais extraídas negativas foram fortificadas com quantidades crescentes de calprotectina provenientes de amostras de soro. Os resultados podem ser vistos na figura 2.



### **Efeito gancho com dose elevada**

Amostras com concentrações teóricas de até 60'000 µg/g podem ser medidas sem limitar a faixa de medição do ensaio.

### **Faixa de trabalho: 30–1800 µg/g**

**Repetibilidade (precisão intraensaio):  
1,7 - 5,8% do CV**

**Precisão intralaboratorial: 3,1 - 9,4% do CV**

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 10 dias x 2 corridas x 4 replicatas. Foram testados sete extratos de amostras fecais agrupadas, com concentrações de calprotectina na faixa de 38,5 – 918,0 µg/g (tabela 16).

**Precisão entre lotes: 4,2–9,7% do CV**

A precisão entre lotes foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 3 lotes x 5 dias x 5 replicatas, e um modelo de componentes de variância para efeitos aleatórios. Foram testados seis extratos de amostras fecais com concentrações de calprotectina na faixa de 46,4 – 1.476,1 µg/g (tabela 17).

**Reprodutibilidade (estudo multicêntrico de avaliação da precisão): 6,4 - 19,0% do CV**

A reprodutibilidade foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de 3 laboratórios x 2 operadores x 5 dias x 2 corridas por dia x 4 replicatas. Três lotes de reagentes foram usados no estudo. Foram testados cinco extratos de amostras fecais agrupadas, com concentrações de calprotectina na faixa de 42,1 – 1.053,3 µg/g (tabelas 18).

**Limite de detecção (LoD): 12,6 µg/g**

O LoD foi determinado de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, com proporções de falsos positivos ( $\alpha$ ) inferiores a 5% e de falsos negativos ( $\beta$ ) inferiores a 5%, com base em 120 determinações com 60 brancos (tampão de extração) e 60 replicatas de baixo nível; e um **LoB de 8,3 µg/g**.

**Limite de quantificação (LoQ): 21,3 µg/g**

O LoQ foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, com base em 60 determinações e uma meta de precisão de 20% do CV.

**Linearidade: 30–1800 µg/g**

A faixa linear do BÜHLMANN fCAL® ELISA foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. Um desvio máximo de  $\pm 20\%$  da linearidade foi permitido. Para valores abaixo de 75 µg/g, uma diferença absoluta inferior a  $\pm 15$  µg/g foi permitida (tabela 19).

**Precisão / recuperação: 96,4–102,2%**

Sete extratos de amostras fecais com níveis de calprotectina variando entre 46,5 µg/g e 990,2 µg/g foram fortificados com 180 µg/g de calprotectina em material de calibrador. A fortificação foi realizada a 10% do volume do extrato da amostra. As amostras de "base" foram fortificadas com a quantidade correspondente de tampão de incubação. As amostras de "base" e as de "base + spike" foram medidas em três replicatas (tabela 20).

### **Fase pré-analítica**

As características de desempenho do BÜHLMANN fCAL® ELISA em termos de procedimentos pré-analíticos foram estabelecidas usando-se a faixa de trabalho de 30–1800 µg/g.

**Reprodutibilidade da extração – extração manual:  
9,5–20,5%**

A reprodutibilidade da extração foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 10 extrações x 2 replicatas. Foram testadas nove amostras fecais clínicas, incluindo amostras com consistência sólida, semissólida e líquida, com concentrações de calprotectina na faixa de 51,2 – 1.783,7 µg/g (tabela 21).

**Reprodutibilidade da extração – CALEX® Cap:  
7,9–16,9%**

A reprodutibilidade da extração foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo com 3 lotes de CALEX® Cap x 4 extrações x 4 replicatas. Foram testadas cinco amostras fecais clínicas, incluindo amostras com consistência sólida, semissólida e líquida, com concentrações de calprotectina na faixa de 42,5 – 2949,9 µg/g (tabela 22).

**Comparação de métodos CALEX® Cap vs. extração manual**

**Desvio a 80 µg/mL: 5,9% (intervalo de confiança de 95%: 1,4–12,2%)**

**Desvio a 160 µg/g: 12,0% (intervalo de confiança de 95%: 7,8–17,0%)**

**Desvio médio: 10,1% (intervalo de confiança de 95%: 5,7–14,5%)**

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz EP09-A3 do CLSI. Duzentas e quarenta e uma (241) amostras clínicas foram extraídas com o auxílio de um único lote do dispositivo CALEX® Cap. Valores de referência com um intervalo final de concentração de calprotectina de 30,5 - 1496,6 µg/g foram estabelecidos usando-se o método manual de extração. Os extratos foram medidos em determinações individuais em ambos os métodos. O desvio foi determinado usando-se análise de regressão linear de Passing-Bablok e análise de Bland-Altman (tabelas 23 e 24).

### **SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES**

A suscetibilidade do BÜHLMANN fCAL® ELISA a produtos farmacêuticos orais, suplementos nutricionais, hemoglobina e micro-organismos enteropatológicos, foi avaliada de acordo com a diretriz EP07-A2 do CLSI, usando-se a faixa de trabalho estendida. Desvios superiores a 10% nos resultados foram considerados como interferências. Nenhuma interferência foi detectada com as substâncias listadas na tabela 25 até as concentrações indicadas. Nenhuma interferência foi detectada com os micro-organismos enteropatológicos listados na tabela 26 até os valores listados de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de extrato fecal.

## TABELAS E FIGURAS

### Estudos clínicos

#### Estudos clínicos – Como distinguir doenças gastrointestinais orgânicas de funcionais

Diagnóstico final	Distribuição dos resultados dos pacientes em números (percentuais) nas faixas de diagnóstico do BÜHLMANN fCAL® ELISA.			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
DII	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
SII	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Outras GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabela 5

DII vs. não DII	Ponto de decisão clínica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Especificidade (95% do IC)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
VPP (95% do IC)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
VPN (95% do IC)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
AUC da curva ROC (95% do IC)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabela 6

DII vs. não DII	Ponto de decisão clínica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Especificidade (95% do IC)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
VPP (95% do IC)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
VPN (95% do IC)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabela 7

DII vs. SII	Ponto de decisão clínica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Especificidade (95% do IC)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
VPP (95% do IC)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
VPN (95% do IC)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
AUC da curva ROC (95% do IC)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabela 8

DII vs. SII	Ponto de decisão clínica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Especificidade (95% do IC)	59,2% (50,3%, 67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
VPP (95% do IC)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
VPN (95% do IC)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabela 9

Não DII - SII + outras GI

IC – intervalo de confiança

VPP – valor preditivo positivo

VPN – valor preditivo negativo

AUC da curva ROC – área sob a curva característica de operação do receptor

### Estudos clínicos – Monitoramento de DII

Atividade da calprotectina <sup>1</sup> vs DII determinada por meio de resultados endoscópicos	Estudo 1 Espanha (ref. 9)	Estudo 2 Espanha (ref. 10)	Estudo 3 Austrália, Nova Zelândia (ref.11)
Quantidade e dados demográficos dos pacientes	89 (DC <sup>2</sup> )  Faixa etária: 32-58 44% homens	123 (CU <sup>3</sup> )  Faixa etária: 18-85 66,4% homens	99 (DC <sup>2</sup> após ressecção)  Faixa etária: 29-47 46,5% homens
Valor de corte	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
VPN	98%	86%	91%
VPP	76%	80,3%	53%

Tabela 10

<sup>1</sup> Estudo 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL e Quantum Blue® fCAL high range

Estudo 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

<sup>2</sup> DC = pacientes com doença de Crohn

<sup>3</sup> CU = pacientes com colite ulcerativa

### Estudos clínicos – Monitoramento de DII

Calprotectina <sup>1</sup> vs remissão ou recidiva clínicas futuras	Estudo 4 Reino Unido (ref. 12)	Estudo 5 Espanha (ref. 13)	Estudo 6 Espanha (ref. 14)
Quantidade e dados demográficos dos pacientes	92 (DC <sup>2</sup> )  38% homens	30 (DC <sup>2</sup> )  terapia com adalimumabe Faixa etária: 24-64 43,3% homens	33 (DC <sup>2</sup> ) 20 (CU <sup>3</sup> ) terapia com infliximabe Faixa etária: 18-68 47,2% homens
Data de retorno depois da medição da calprotectina	12 meses	4 meses	12 meses
Pacientes com recidiva clínica depois do retorno	11%	30%	23%
Valor de corte	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
VPN	96,8%	100%	96,1%
VPP	27,6%	75%	68,7%

Tabela 11

<sup>1</sup> Estudo 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Estudo 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL e Quantum Blue® fCAL high range

<sup>2</sup> DC = pacientes com doença de Crohn

<sup>3</sup> CU = pacientes com colite ulcerativa

## TABELAS E FIGURAS

### PROCEDIMENTO DE FAIXA MAIS BAIXA 10-600 µg/g

#### Exemplo de resultados

	Conc. [µg/g]	Absorb. [DO]	Conc. calc. [µg/g]	Conc. CV [%]
<b>Méd. branco</b>		<b>0,096</b>		
Cal A	10	0,073		
Cal A	10	0,066		
<b>Méd. Cal A</b>	<b>10</b>	<b>0,069</b>		<b>7,2</b>
Cal B	30	0,143		
Cal B	30	0,153		
<b>Méd. Cal B</b>	<b>30</b>	<b>0,148</b>		<b>4,8</b>
Cal C	100	0,465		
Cal C	100	0,456		
<b>Méd. Cal C</b>	<b>100</b>	<b>0,460</b>		<b>1,4</b>
Cal D	300	1,121		
Cal D	300	1,135		
<b>Méd. Cal D</b>	<b>300</b>	<b>1,128</b>		<b>0,9</b>
Cal E	600	1,658		
Cal E	600	1,671		
<b>Méd. Cal E</b>	<b>600</b>	<b>1,664</b>		<b>0,6</b>
Controle baixo		0,201	41	
Controle baixo		0,189	39	
<b>Méd. controle baixo</b>		<b>0,195</b>	<b>40</b>	<b>4,4</b>
Controle alto		0,598	134	
Controle alto		0,583	130	
<b>Méd. controle alto</b>		<b>0,590</b>	<b>132</b>	<b>1,8</b>

Tabela 12

#### Exemplo de curva padrão

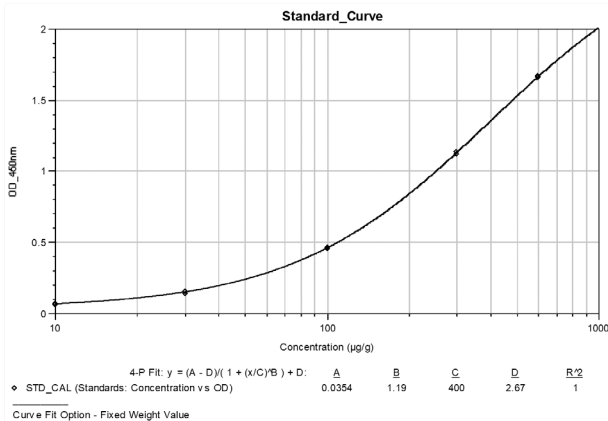


Figura 1

#### Precisão intralaboratorial

Núm. da amostra	n	Média [µg/g]	Repetibilidade:		Interdias		Precisão total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
#1957	44	13,2	1,0	8,0%	1,5	11,6%	1,8	14,0%
#1933	42	20,5	0,9	4,2%	1,6	7,7%	1,8	8,8%
#1934	44	19,7	1,2	6,0%	1,6	8,4%	2,0	10,3%
#1935	44	37,1	1,2	3,2%	2,1	5,8%	2,4	6,7%
#1936	44	35,4	0,9	2,7%	2,5	7,4%	2,7	7,8%
#1937	44	58,6	1,6	2,9%	3,6	6,4%	3,9	7,0%
#1938	44	83,9	2,6	3,1%	4,3	5,2%	5,0	6,0%
#1939	44	141,4	2,6	1,9%	7,1	5,2%	7,5	5,5%
#1956	44	294,1	14,0	4,8%	18,0	6,2%	22,8	7,8%
#1940	44	501,4	27,7	5,7%	20,9	4,3%	34,7	7,1%

Tabela 13

#### Linearidade

ID	Faixa de medição testada	R <sup>2</sup>	valor p para coeficiente não linear	Faixa linear
S1	2,3 – 740,0	0,972	p > 0,05	3,1 – 602,8
S2	5,1 – 999,5	0,988	p < 0,05	5,1 – 654,0
S3	1,3 – 690,2	0,994	p < 0,05	3,9 – 690,2
S4	9,6 – 827	0,940	p < 0,05	9,6 – 658,7

Tabela 14

#### Recuperação de traçador (spike):

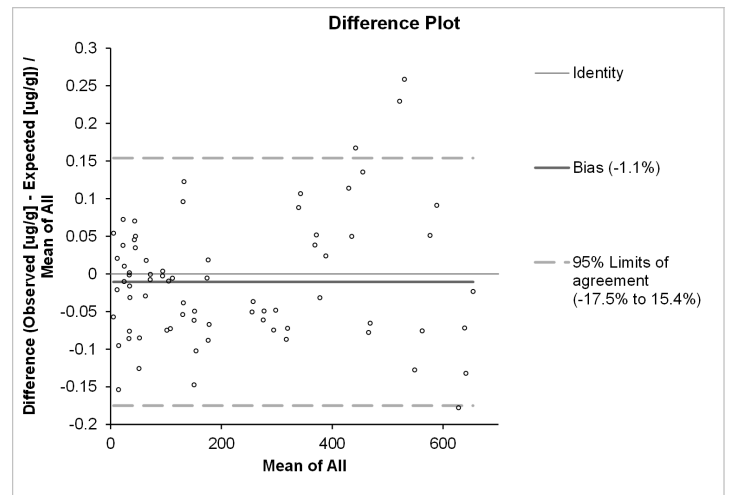


Figura 2

## TABELAS E FIGURAS

### PROCEDIMENTO DE FAIXA ESTENDIDA, 30-1800 µg/g

#### Exemplo de resultados

	Concentração [µg/g]	Absorbância [DO]
Calibrador A	30	0,047
	30	0,046
Calibrador B	90	0,138
	90	0,140
Calibrador C	300	0,464
	300	0,452
Calibrador D	900	1,207
	900	1,192
Calibrador E	1800	1,627
	1800	1,630
Méd. branco		0,057
Controle baixo		0,147
		0,162
Controle alto		0,618
		0,618

Tabela 15

#### Exemplo de curva padrão

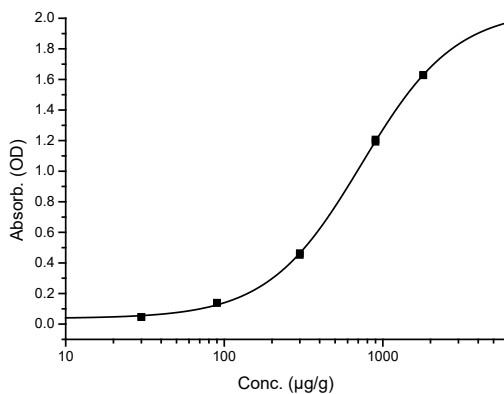


Figura 3

#### Precisão intralaboratorial

ID	Média [µg/g]	n	Repetibilidade		Inter-corridas		Interdias		Intralaboratorial	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
P1	38,5	80	2,3	5,8%	1,8	4,8%	2,2	5,6%	3,6	9,4%
P2	67,0	80	2,0	3,0%	3,5	5,2%	1,6	2,4%	4,3	6,4%
P3	135,7	80	2,3	1,7%	5,6	4,1%	0,0	0,0%	6,0	4,4%
P4	207,1	80	4,1	2,0%	12,5	6,0%	0,0	0,0%	13,2	6,4%
P5	337,1	80	5,9	1,8%	18,3	5,4%	0,0	0,0%	19,3	5,7%
P6	562,6	80	11,0	2,0%	13,6	2,4%	2,5	0,4%	17,7	3,1%
P7	918,0	80	18,6	2,0%	62,1	6,8%	20,8	2,3%	68,1	7,4%

Tabela 16

#### Precisão entre lotes

ID	Mean [µg/g]	n	Intracorrída		Interdias		Entre lotes		Total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
2	46,4	74	2,5	5,5%	0,5	1,1%	2,4	5,3%	4,5	9,7%
3	105,5	75	2,5	2,4%	1,4	1,4%	2,1	2,0%	4,5	4,2%
4	133,6	75	5,0	3,8%	1,9	1,4%	4,2	3,2%	7,2	5,4%
5	178,5	75	6,3	3,5%	0,0	0,0%	6,3	3,5%	9,2	5,2%
6	435,2	75	12,4	2,9%	7,5	1,7%	18,1	4,2%	23,2	5,3%
7	1476,1	75	48,4	3,3%	88,6	6,0%	31,4	2,1%	110,6	7,5%

Tabela 17

#### Reprodutibilidade - estudo multicêntrico de avaliação da precisão

ID	Média [µg/g]	n	Interoperadores		Intercentros		Total (reprodutibilidade)	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	42,1	236	0,0	0,0%	4,4	10,4%	8,0	19,0%
S02	67,4	238	1,7	2,6%	3,9	5,7%	8,6	12,7%
S03	142,3	238	2,4	1,7%	4,0	2,8%	16,8	11,8%
S04	379,8	240	0,0	0,0%	13,7	3,6%	24,2	6,4%
S05	1053,3	238	39,5	3,8%	64,4	6,1%	97,3	9,2%

Tabela 18

#### Linearidade

ID	Faixa de medição testada [µg/g]	R <sup>2</sup>	valor p para coeficiente não linear	Faixa linear [µg/g]
FRB	22,8 – 1932,0	0,998	p < 0,05	24,6 – 1932,0
FRC	26,2 – 2096,2	0,997	p < 0,05	26,2 – 2096,2

Tabela 19

#### Precisão / recuperação

ID	Média da base [µg/g]	Base + spike, esperada [µg/g]	Base + spike, observada [µg/g]	Recuperação [%]
#1	46,5	226,5	224,5	99,1%
#2	63,7	243,7	247,7	101,6%
#3	89,0	269,0	274,9	102,2%
#4	111,6	291,6	292,0	100,1%
#5	163,5	343,5	331,1	96,4%
#6	304,0	484,0	475,0	98,1%
#7	990,2	1170,2	1166,6	99,7%

Tabela 20

## TABELAS E FIGURAS

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO – FASE PRÉ-ANALÍTICA

Reprodutibilidade da extração – extração com pesagem manual

ID	Média [µg/g]	n	Intraextração		Interextrações		Total precisão	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	51,2	20	4,5	8,9%	7,8	15,2%	9,0	17,6%
S03	88,3	20	6,6	7,5%	13,3	15,0%	14,8	16,8%
S05	66,8	20	10,6	15,8%	3,7	5,5%	11,2	16,7%
S06	179,3	20	16,8	9,4%	32,8	18,3%	36,8	20,5%
S07	366,1	20	22,4	6,1%	32,3	8,8%	39,3	10,7%
S08	327,4	20	15,4	4,7%	26,9	8,2%	31,0	9,5%
S09	1783,7	20	198,3	11,1%	262,0	14,7%	328,6	18,4%

Tabela 21

Reprodutibilidade da extração – CALEX® Cap

ID	Média [µg/g]	Intra-extração		Inter-extrações		Interlotes		Total precisão	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	42,5	1,6	3,9%	5,2	12,1%	0,0	0,0%	5,4	12,7%
B	126,5	3,2	2,5%	9,6	7,6%	9,3	7,4%	13,8	10,9%
C	207,4	5,1	2,4%	34,8	16,8%	0,0	0,0%	35,1	16,9%
D	515,5	13,9	2,7%	38,2	7,4%	0,0	0,0%	40,7	7,9%
E	2949,9	93,0	3,2%	214,6	7,3%	47,0	1,6%	238,6	8,1%

Tabela 22

Comparação de métodos – Extração com CALEX® Cap vs. extração manual

Análise de Bland-Altman		
Desvio médio (95%)	Desvio médio (95%)	Desvio médio (95%)
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabela 23

Análise de regressão de Passing-Bablok				
Inclinação (95% do IC)	Inclinação (95% do IC)	Inclinação (95% do IC)	Inclinação (95% do IC)	Inclinação (95% do IC)
1,181 (1,120, 1,235)	-9,7 (-16,0, -2,4)	5,9% (1,4%, 12,2%)	12,0% (7,8%, 16,9%)	0,948

Tabela 24

## SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Produtos farmacêuticos orais, suplementos nutricionais e hemoglobina

Nome comercial	Componente ativo	Concentration mg/50 mg stool
gyno-Tardyferon	Sulfato de ferro (II) (contém 0,35 mg de ácido fólico)	0,11
Prednisona	Prednisona	0,31
Imurek	Azatioprina	0,19
Salofalk	Mesalamina; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazol	0,18
Asacol	Mesalamine; 5-ASA	2,50
Vancocina	Vancomicina	2,00
Sulfametoxazol	Sulfametoxazol	1,60
Trimetoprima	Lactato de trimetoprima	0,35
Ciproxina	Ciproflaxacina	1,25
Vitamina E	DL- $\alpha$ acetato de tocoferol	0,30
Bion 3	3 probióticos (107 UFC): lactobacillus gasseri PA16 / 8, bifidobacterium bifidum MF 20/5 e bifidobacterium longum SP07 / 3, 12 vitaminas: A (800 µg), B1 (1,4 mg), B2 (1,6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 µg), C (60 mg), D (5 µg), E (10 mg), biotina (150 µg), ácido fólico (200 µg), niacina (18 mg), ácido pantotênico (6 mg), e 7 minerais: iodo (100 µg), ferro (5 mg), zinco (5 mg), selênio (30 µg), cromo (25 µg), manganês (1,2 mg) e molibdênio (25 µg)	1,06
Hemoglobina	Hemoglobina	1,25

Tabela 25

## Micro-organismos enteropatológicos

Nome	Concentração final (UFC/ml, extrato fecal)
<i>Escherichia coli</i>	$9,5 \times 10^7$
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	$1 \times 10^9$
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia</i>	$5,4 \times 10^7$
<i>Citrobacter freundii</i>	$9,7 \times 10^7$
<i>Shigella flexneri</i>	$1,5 \times 10^8$
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	$1,6 \times 10^8$

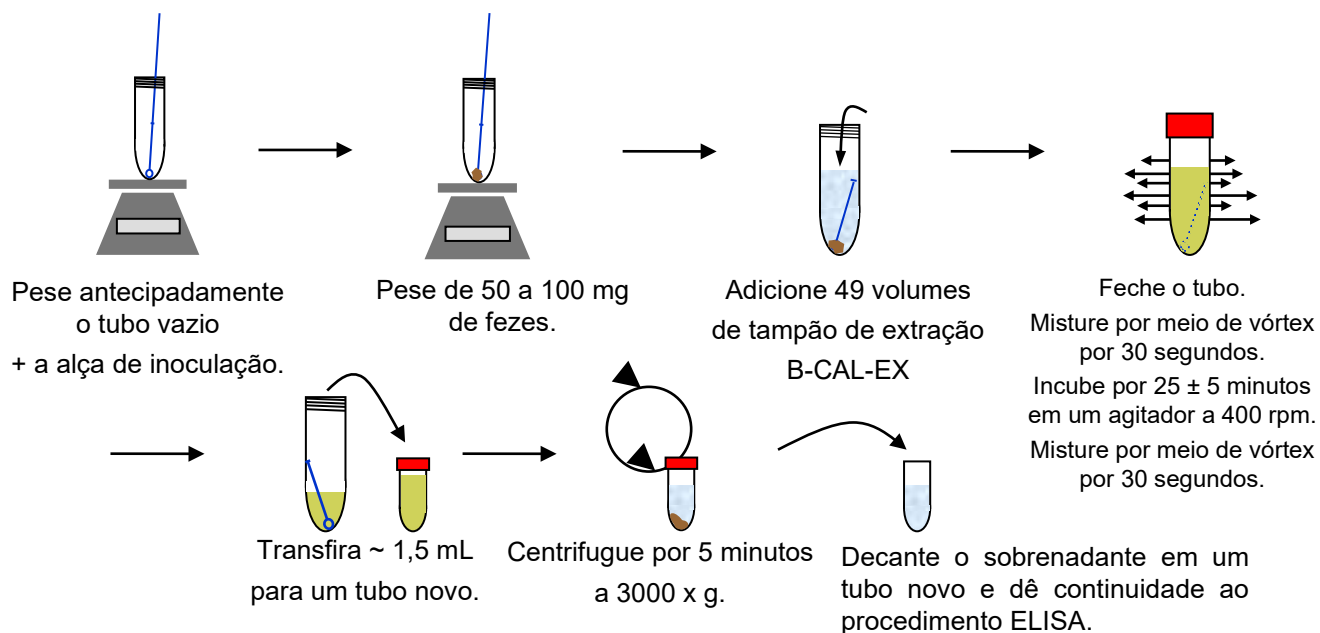
Tabela 26

## REFERÊNCIAS

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces.*: Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease*. J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreiro-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab*. Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreiro-Iglesias R1 et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy*. J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis In Clinical And Endoscopic Remission*. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasson A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study*. United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target*. Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents In Inflammatory Bowel Disease Patients In Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al.: *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 19, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months*. PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

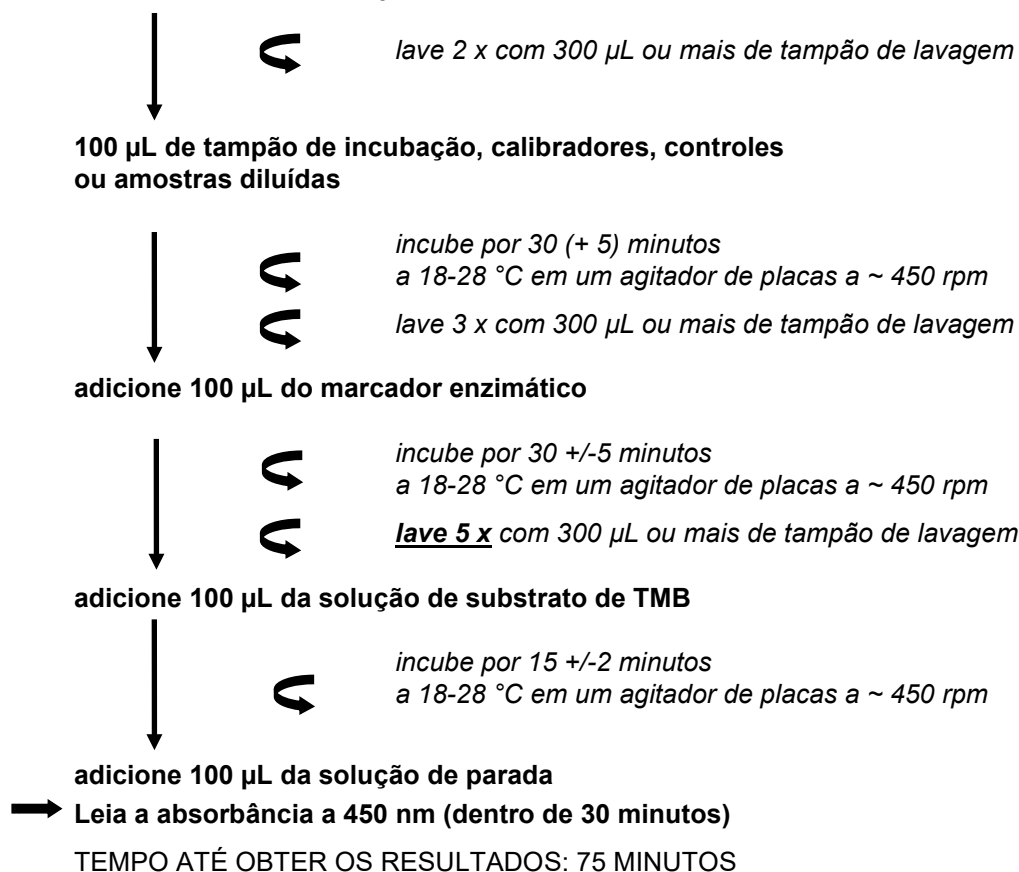
## EXTRAÇÃO DE CALPROTECTINA

### Procedimento de extração manual



## CALPROTECTINA ELISA

### Placa de microtitulação pré-revestida



## HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Data	Versão	Alteração
2022-11-16	A3	Atualização do capítulo <i>Advertências e precauções</i> Inclusão dos valores de incerteza dos calibradores e justificativa da padronização interna no capítulo <i>Padronização</i> . Atualização e simplificação da redação do capítulo <i>Características de desempenho</i> , revisão do capítulo <i>Símbolos</i> novas informações sobre patentes Inclusão do número do órgão notificado na marcação CE - procedimento de avaliação de conformidade, de acordo com a regulamentação IVDR 2017/746

## NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE









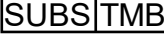

Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

## DANOS DE TRANSPORTE

Informe seu distribuidor caso o produto seja recebido danificado.

## SÍMBOLOS

BÜHLMANN utiliza símbolos e sinais listados e descritos na ISO 15223-1. Além disso, são utilizados os seguintes símbolos e letreiros:

Símbolo	Explicação
	Placa de microtitulação
	Tampão de extração
	Tampão de lavagem concentrado (10x)
	Tampão de incubação
	Calibrador A – E
	Controle Baixo
	Controle Alto
	Marcador enzimático
	Substrato de TMB
	Solução de parada

Partes do kit são protegidas por patente EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2).

