

RIDASCREEN® Calprotectin

REF G09036



1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDASCREEN® Calprotectin est un test immunoenzymatique destiné à la détection quantitative de la calprotectine humaine dans des échantillons de selles.

2. Résumé et explication du test

La calprotectine est une protéine de liaison au calcium produite par des cellules comme les neutrophiles, et libérée en cas d'inflammation.

La calprotectine fécale sert de biomarqueur en cas d'inflammation gastro-intestinale ou de néoplasie au niveau des voies gastro-intestinales.

La calprotectine (également appelée MRP-8/14, calgranuline A/B ou S100A8/A9) est une protéine du groupe S100 qui se lie au calcium et au zinc.

Dans des conditions physiologiques, la calprotectine se lie au calcium, ce qui la rend particulièrement stable et très résistante à la chaleur et à la protéolyse.

La calprotectine est produite par les neutrophiles (granulocytes neutrophiles) et les monocytes. Dans les neutrophiles, la concentration en calprotectine dans le cytosol varie de 5 à 15 mg/l, ce qui représente environ 60 % de la fraction protéique cytosolique soluble et 5 % de la fraction protéique totale de ces cellules.

La fonction biologique de la calprotectine n'est pas encore tout à fait comprise. On suppose qu'elle joue un rôle biologique en protégeant les cellules contre les protéases leucocytaires et bactériennes. Elle aurait également des propriétés antibactériennes en raison de sa capacité de liaison au zinc. La calprotectine présente également des propriétés de régulation intra et extracellulaire lors des processus inflammatoires.

En cas de maladie inflammatoire de l'intestin, les granulocytes migrent dans la lumière intestinale et libèrent la calprotectine qui est excrétée dans les selles. Dans les selles, la concentration en calprotectine correspond au nombre de granulocytes neutrophiles ayant migré dans la lumière intestinale pour y libérer la calprotectine. La concentration en calprotectine fécale peut donc être utilisée pour mesurer le nombre de granulocytes présents dans la lumière intestinale et comme indicateur de la gravité de l'inflammation intestinale.

La mesure de la calprotectine fécale présente un intérêt clinique particulier dans la mesure où elle permet un diagnostic fiable de l'inflammation des voies intestinales. Les symptômes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont souvent très similaires à ceux du syndrome du côlon irritable (SCI). La concentration en calprotectine fécale indique clairement la présence d'une inflammation dans l'intestin. L'utilisation de ce biomarqueur permet donc d'éviter une coloscopie inutile aux nombreux patients atteints du syndrome du côlon irritable.

De nombreuses publications ont démontré que les concentrations en calprotectine fécale étaient étroitement corrélées aux résultats histologiques et endoscopiques de l'activité pathologique chez les patients atteints de MICI. La mesure de la calprotectine fécale permet donc d'évaluer objectivement la réponse au traitement

chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et de surveiller ces patients pendant la rémission clinique afin de permettre la détection précoce et le traitement des récives.

La mesure de la calprotectine fécale permet de :

- Différencier clairement les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin du syndrome du côlon irritable
- Détecter précocement les poussées de maladies inflammatoires de l'intestin
- Documenter objectivement la gravité de l'inflammation à des fins de suivi de la réponse au traitement
- Fournir un marqueur pour les inflammations aiguës de l'intestin

3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® Calprotectin utilise des anticorps spécifiques en appliquant une méthode de type sandwich. La surface des puits de la plaque de microtitrage est revêtue d'anticorps monoclonaux dirigés contre la calprotectine humaine. Une suspension de l'échantillon de selles à tester est pipetée dans un puits de la plaque de microtitrage, puis incubée. Cette étape est suivie d'une étape de lavage, puis d'une seconde incubation avec un anticorps monoclonal conjugué à de la peroxydase de raifort. En présence de calprotectine, l'anticorps immobilisé, la calprotectine et l'anticorps conjugué forment un complexe en sandwich. Les anticorps marqués à l'enzyme non liés sont éliminés au cours de l'étape de lavage suivante. Dans les échantillons positifs, après l'ajout d'un substrat, l'enzyme liée fait virer la solution incolore au bleu dans les puits de la plaque de microtitrage. L'ajout d'un réactif stop fait virer la couleur du bleu au jaune. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en calprotectine de l'échantillon.

4. Contenu de la trousse

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 déterminations.

Plate	96 tests	Plaque de microtitrage, 12 barrettes de microtitrage (sécables) sur un support ; revêtue d'anticorps monoclonaux (de souris) dirigés contre la calprotectine humaine
Extract	2x 100 ml	Tampon d'extraction (conc. 3x) ; Tampon Tris ; contient 0,05 % de NaN ₃
Diluent 3	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon 3 (pour dilution finale), solution de NaCl tamponnée à la protéine ; contient 0,1 % de NaN ₃ ; prêt à l'emploi ; coloration rouge
Wash buffer	100 ml	Tampon de lavage 10x (concentré 10 fois) ; solution de NaCl tamponnée au phosphate ; contient 0,1 % de thimérosal
Calibrator	1 ml	Calibreur (procédure d'étalonnage à un point) ; contient 0,1 % de NaN ₃ ; prêt à l'emploi
Standard 1 à Standard 5	1 ml	5 étalons (si une courbe standard est utilisée) ; concentrations en calprotectine des étalons 1 à 5 : 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg ; contient 0,1 % de NaN ₃ ; prêt à l'emploi
Control +	1 ml	Contrôle positif ; contient 0,1 % de NaN ₃ ; prêt à l'emploi
Low control +	1 ml	Contrôle positif faible ; contient 0,1 % de NaN ₃ ; prêt à l'emploi
Conjugate	12 ml	Anticorps monoclonal (souris) conjugué à de la peroxydase dans une solution protéique stabilisée ; prêt à l'emploi
SeroSC	12 ml	Substrat ; peroxyde d'hydrogène/TMB ; prêt à l'emploi
Stop	12 ml	Réactif stop ; acide sulfurique 1 N ; prêt à l'emploi

Les substances dangereuses sont signalées conformément aux dispositions d'étiquetage obligatoires. Pour en savoir plus, consulter la Fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse www.r-biopharm.com.

5. Instructions de conservation des réactifs

Tous les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Dans ces conditions, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette correspondante. Le tampon de lavage dilué doit être conservé entre 2 et 8 °C pendant 4 semaines maximum. Le tampon d'extraction dilué est stable pendant 6 mois lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C et au maximum jusqu'à la date de péremption du concentré. La contamination microbienne doit être évitée. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie. Utiliser des ciseaux pour ouvrir le sachet en aluminium contenant les barrettes de microtitrage afin de ne pas arracher le joint d'étanchéité. Les barrettes de microtitrage qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C. Le substrat incolore doit également être protégé de la lumière directe pour éviter qu'il ne se décompose ou ne bleuisse sous l'effet d'une auto-oxydation. Lorsque le substrat est bleu, il ne doit pas être utilisé.

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

6.2. Matériel

- Micro-balance ou flacon de coproculture RIDA[®]TUBE Calprotectin (réf. GZ3016)
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.4)
- Micropipette pour volumes de 20 à 100 µl et 1 ml
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre
- Appareil de lavage pour plaques de microtitrage ou pipettes multicanaux (300 µl)
- Photomètre pour plaques de microtitrage (450 nm ; filtre de référence ≥ 620 nm)
- Papier filtre (lingettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets contenant 0,5 % de solution d'hypochlorite

7. Mesures de précaution

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

Les échantillons de selles doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux, conformément aux exigences de sécurité nationales.

Les échantillons ou réactifs ne doivent pas être pipetés à la bouche et tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées doit être évité. Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons et se laver les mains une fois le test terminé. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs de test sont manipulés.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

Le tampon de lavage contient du thimérosal à 0,1 % en tant que conservateur. Cette substance ne doit pas entrer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses. Le calibre, les étalons, le contrôle positif, le contrôle positif faible, le tampon d'extraction et de dilution d'échantillon contiennent 0,05 % ou 0,1 % de NaN_3 comme conservateur. Le tampon d'extraction contient également du chlorure de guanidinium comme agent de renaturation et de dénaturation. Cette substance ne doit pas entrer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses.

Le peroxyde d'hydrogène (substrat) peut provoquer des brûlures. Le manipuler avec prudence.

Le réactif stop contient de l'acide sulfurique 1 N. Éviter tout contact avec la peau et les vêtements. Si le réactif entre en contact avec la peau, rincer la peau avec de l'eau.

Tous les réactifs et matériaux entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants adaptés ou passés en autoclave à 121 °C pendant au moins une heure. MISE EN GARDE : Pour éviter que des gaz toxiques ne se forment, tout déchet liquide contenant du réactif stop doit être neutralisé avant d'ajouter la solution d'hypochlorite.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons de selles doivent être transportés réfrigérés, dans la mesure du possible, et conservés entre 2 et 8 °C avant le test. Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement après réception (dans les 3 jours), il est recommandé de les conserver à -20 °C ou une température inférieure. Lorsque les échantillons de selles sont congelés, les granulocytes neutrophiles peuvent éclater et libérer de la calprotectine, ce qui peut donner lieu à une légère augmentation de la concentration en calprotectine dans les échantillons congelés par rapport aux échantillons frais. Éviter de congeler et décongeler l'échantillon plusieurs fois. Les échantillons de

selles ne doivent pas être recueillies dans des conteneurs de transport renfermant un milieu de transport et des conservateurs, du sérum animal, des ions métalliques, des agents oxydants ou des détergents, car ces substances peuvent interférer avec le test RIDASCREEN® Calprotectin.

9. Réalisation du test

9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la plaque de microtitrage [Plate] doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation. Sortir les barrettes de microtitrage du sachet en aluminium une fois qu'elles ont atteint la température ambiante. Bien mélanger les réactifs juste avant utilisation. Après utilisation, les barrettes de microtitrage (placées dans des sachets fermés hermétiquement) et les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Une fois utilisées, les barrettes de microtitrage ne doivent pas être réutilisées. Ne pas utiliser les réactifs ou les barrettes de microtitrage si l'emballage est endommagé ou si les contenants fuient. Pour éviter toute contamination croisée, les échantillons ne doivent pas entrer en contact direct avec les composants de la trousse. Le test ne doit pas être réalisé à la lumière directe du soleil. Nous recommandons de couvrir la plaque de microtitrage ou de placer un film plastique dessus pour éviter toute perte par évaporation.

9.2. Préparation de la solution tampon

Mélanger 1 volume de concentré de solution tampon [Wash] dans 9 volumes d'eau distillée (1:10). Pour cette étape, verser 100 ml de concentré dans une éprouvette graduée de 1 000 ml, puis compléter le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 1 000 ml. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent être préalablement dissous à chaud (bain-marie à 37 °C).

9.3. Préparation du tampon d'extraction

Mélanger 1 volume de tampon d'extraction [Extract] (100 ml) dans 2 volumes d'eau distillée (200 ml) (1:3).

9.4. Préparation des échantillons

Les échantillons de selles doivent, si possible, être conservés entre 2 et 8 °C avant utilisation. En cas de conservation prolongée (> 3 jours), les maintenir à -20 °C ou à une température inférieure. Les échantillons congelés doivent être ramenés lentement à température ambiante.

9.4.1 Préparation et mise en suspension des échantillons par pesée

Peser 100 mg d'échantillon de selles dans un tube à essai étiqueté, puis ajouter 5 ml de tampon d'extraction dilué à l'aide d'une pipette (dilution 1:50).

Il est également possible de placer entre 80 et 130 mg d'échantillon de selles dans le tube à essai, puis de le mettre en suspension dans un volume proportionnel de tampon d'extraction dilué (voir tableau 1) pour conserver un rapport de dilution constant (1:50).

Tableau 1 : Quantités de tampon d'extraction dilué requises en fonction de la quantité de selles pesée

Poids de l'échantillon [mg]	Volume [ml]
80	4,00
85	4,25
90	4,50
95	4,75
100	5,00
105	5,25
110	5,50
115	5,75
120	6,00
125	6,25
130	6,50

Lors de la remise en suspension dans un volume fixe de 5 ml de tampon d'extraction, le facteur de dilution variable doit être pris en compte dans le calcul (voir tableau 2).

Tableau 2 : Facteur de dilution lors de l'ajout constant au tampon d'extraction dilué (5 ml) en fonction de la quantité de selles pesée

Poids de l'échantillon [mg]	Volume [ml]
80	62,50
85	58,82
90	55,55
95	52,63
100	50,00
105	47,62
110	45,45
115	43,45
120	41,66
125	40,05
130	38,46

Quelle que soit la méthode employée pour peser l'échantillon, la suspension de selles est homogénéisée en la mélangeant complètement dans un malaxeur au vortex. Si les selles sont liquides, utiliser une pipette pour prélever précisément

100 µl et les mettre en suspension dans exactement 5 ml de tampon d'extraction dilué.

Après ajout du tampon d'extraction, les échantillons doivent être incubés pendant 5 minutes à température ambiante, puis remélangés complètement au vortex. La suspension homogénéisée doit ensuite être centrifugée à plus de 3 000 g pendant 10 minutes pour décanter les particules de selles grossières. Le surnageant de l'extrait doit être dilué davantage puis utilisé immédiatement pour le test.

a. Dilution manuelle de l'échantillon

Diluer 20 µl de surnageant clarifié dans 980 µl de tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN® [Diluent | 3] (1:50). Utiliser 100 µl de l'échantillon de selles final dilué pour effectuer le test.

Les échantillons peuvent également être préparés et homogénéisés à l'aide du flacon de coproculture RIDA®TUBE Calprotectin (réf. GZ3016, voir rubrique 9.4.2).

b. Dilution d'échantillon dans un système automatisé

Si le test doit être effectué sur un système ELISA automatisé DSX (Dynex Technologies, Inc.), le protocole de test à appliquer doit être obtenu auprès de R-Biopharm AG et installé sur le système. L'échantillon est ensuite dilué automatiquement comme expliqué ci-dessous.

Le système ELISA automatique pipette un volume de 20 µl du surnageant clarifié dans une plaque à puits profonds, puis le dilue dans 980 µl de [Diluent | 3] dilué (1:50). Deux cycles de mélange sont réalisés.

Le nombre requis de barrettes de microtitrage est placé dans le support de la plaque de microtitrage RIDASCREEN® Calprotectin [Plate]. Transférer 100 µl du tampon de dilution d'échantillon de la plaque à puits profonds dans la plaque de microtitrage RIDASCREEN® Calprotectin [Plate] (dilution finale 1:2 500).

Pour obtenir des instructions sur l'exécution du test avec d'autres systèmes de pipetage automatisés ELISA, contacter R-Biopharm AG.

9.4.2 Préparation et mise en suspension de l'échantillon dans le flacon de coproculture RIDA®TUBE Calprotectin (réf. GZ3016)

Le flacon de coproculture RIDA®TUBE Calprotectin (réf. GZ3016) est une alternative rapide et propre de pesée des échantillons de selles en vue de la mise en suspension des échantillons de selles telle que décrite à la rubrique 9.4.1. Proposé en tant qu'accessoire du test RIDASCREEN® Calprotectin, il simplifie considérablement la préparation de l'échantillon.

Ajouter 10 mg d'échantillon de selles dans le flacon de coproculture RIDA®TUBE Calprotectin pré-rempli avec 2,5 ml de tampon d'extraction prêt à l'emploi. Si l'échantillon de selles est liquide, il est possible d'en prélever 10 µl à l'aide de la pipette, puis de placer directement l'échantillon pipeté dans le tampon d'extraction. La procédure de prélèvement et d'extraction d'échantillon est décrite de manière détaillée dans les instructions fournies dans l'emballage de chaque flacon de

coproculture RIDA[®]TUBE Calprotectin. Cette notice peut également être téléchargée sur le site www.r-biopharm.com.

Il est recommandé d'utiliser les extraits de selles dans le test immédiatement après dilution.

a. Dilution manuelle de l'échantillon

Comme décrit dans la rubrique 8 du mode d'emploi du GZ3016, 100 µl de la suspension de selles obtenue à l'aide du flacon de coproculture RIDA[®]TUBE Calprotectin (réf. GZ3016) sont dilués dans 900 µl de tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN[®] [Diluent | 3]. 100 µl de l'échantillon de selles final dilué sont immédiatement utilisés dans le test.

b. Dilution d'échantillon dans un système automatisé

Si le test doit être effectué sur un système ELISA automatisé DSX (Dynerx Technologies, Inc.), le protocole de test à appliquer doit être obtenu auprès de R-Biopharm AG et installé sur le système.

Le nombre requis de barrettes de microtitrage est placé dans le support de la plaque de microtitrage RIDASCREEN[®] Calprotectin [Plate]. La suspension de selles extraite avec le tube de selles est automatiquement diluée selon un rapport 1:10 dans la plaque de microtitrage [Plate] du système ELISA (dilution finale 1:2 500). 10 µl de la suspension de selles sont pipetés directement du flacon de coproculture RIDA[®]TUBE Calprotectin (réf. GZ3016) dans la plaque de microtitrage de la calprotectine, puis de nouveau dilués dans 90 µl de [Diluent | 3].

Pour obtenir des instructions sur l'exécution du test avec d'autres systèmes de pipetage automatisés ELISA, contacter R-Biopharm AG.

9.5. Première incubation

Après avoir placé un nombre de puits suffisant dans le support, ajouter 100 µl de calibre [Calibrator] (procédure d'étalonnage à un point, recommandée en double) ou 100 µl des étalons 1 à 5 [Standard 1] - [Standard 5] (procédure d'étalonnage à un point, recommandée en double), puis 100 µl de tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN[®] [Diluent | 3] (=contrôle négatif), de contrôle positif [Control | +] et de dilution finale de l'échantillon de selles à analyser dans les puits correspondants. Si un contrôle positif faible [Low control | +] est utilisé, en ajouter également 100 µl dans le test. Ensuite, incuber la plaque pendant une heure à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

9.6. Premier lavage

Il est important de réaliser le lavage soigneusement pour obtenir des résultats corrects et donc, de respecter les instructions à la lettre. La substance incubée dans les puits doit être vidée dans un conteneur de déchets contenant la solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Ensuite, tapoter la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité restante. Laver ensuite la plaque 5 fois en utilisant 300 µl de solution tampon diluée à chaque fois (voir rubrique 9.2). S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé après chaque lavage.

Remarque : Lorsqu'un laveur de microplaques est utilisé, s'assurer qu'il est correctement réglé par rapport au type de plaque de microtitrage utilisée. En outre, une suspension de selles qui contient encore des particules avant le premier lavage doit être homogénéisée manuellement par centrifugation pour éviter d'obstruer les aiguilles de lavage.

Remarque : S'assurer également que tout le liquide est aspiré à chaque étape de lavage. Après le dernier lavage, tapoter soigneusement la plaque sur du papier absorbant propre ou des serviettes de laboratoire pour s'assurer que toute humidité résiduelle a été éliminée.

9.7. Seconde incubation

Ajouter 100 µl du conjugué **Conjugate** dans chaque puits. Ensuite, incuber la plaque pendant une heure à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

9.8. Deuxième lavage

Au terme de la période d'incubation, vider le conjugué présent dans les puits dans un conteneur de déchets contenant une solution d'hypochlorite à des fins de désinfection. Ensuite, tapoter la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité restante. Puis, laver la plaque cinq fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage dilué. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé après chaque lavage.

9.9. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **SeroSC** dans chaque puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (entre 20 et 25 °C), dans le noir, pendant 15 minutes. Puis, arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de réactif stop **Stop** dans chaque puits. Après un mélange soigneux (en tapotant légèrement le côté de la plaque), mesurer l'absorbance à 450 nm et à une longueur d'onde de référence de 620 nm.

Remarque : des échantillons de patients fortement positifs peuvent entraîner des précipités noirâtres du substrat. Ces échantillons doivent être dilués au 1:10 et réutilisés dans le test (voir rubrique 9.5). (dilution finale de l'échantillon de selles : 1:25000).

10. Contrôle qualité — Signes de détérioration des réactifs

À des fins de contrôle qualité, chaque fois qu'un test est effectué, il est nécessaire d'utiliser le calibreur **Calibrator** (procédure d'étalonnage à un point, recommandée en double) ou les étalons 1 à 5 **Standard 1** – **Standard 5**, le tampon de dilution d'échantillon RIDASCREEN® **Diluent | 3** servant de contrôle négatif, et le contrôle positif **Control | +** pour vérifier la stabilité des réactifs et la réalisation correcte du test. L'utilisation du contrôle positif faible est facultative.

Le test a été correctement effectué si l'extinction moyenne (DO) du contrôle négatif à 450 nm/620 nm est inférieure à 0,05 et si l'extinction moyenne (DO) du calibreur (procédure d'étalonnage à un point) se situe dans la plage indiquée sur la fiche technique jointe. Lorsque le calibreur et les cinq étalons sont utilisés, le contrôle positif fournit des informations concernant la validité du test. La plage de concentration doit se situer dans la plage spécifique au lot indiquée sur la fiche technique.

Lorsque le test RIDASCREEN® Calprotectin est effectué dans des systèmes ELISA ouverts et entièrement automatisés, la valeur DO mesurée du calibreur **Calibrator** (procédure d'étalonnage à un point) peut s'écarter de la plage indiquée dans le certificat spécifique au lot du système. Dans les systèmes ELISA entièrement automatisés, la validité des résultats du test dépend du contrôle positif **Control | +** ; celui doit donc être systématiquement testé. Il n'est pas indispensable d'utiliser le contrôle positif faible **Low control | +**.

Tout écart par rapport aux valeurs requises, toute présence de turbidité ou d'une coloration bleue du substrat incolore avant le remplissage des puits, pourrait indiquer une dénaturation des réactifs. En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Performances fonctionnelles de l'équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Réalisation correcte du test
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

La concentration en calprotectine en mg/kg de selles est déterminée à l'aide du test ELISA RIDASCREEN® Calprotectin, soit par la procédure d'étalonnage à un point (voir rubrique 11.1) selon la loi log-logistique à 4 paramètres (4PL), soit à l'aide de la courbe standard (voir rubrique 11.2).

Le logiciel d'évaluation RIDA®SOFT Win.net est nécessaire pour calculer les résultats. Le logiciel RIDA®SOFT Win.net ou des mises à jour sont disponibles sur demande auprès de R-Biopharm AG ou du distributeur R-Biopharm local.

D'autres logiciels d'évaluation qui proposent la loi log-logistique à 4 paramètres peuvent être utilisés à la place de RIDA®SOFT Win.net.

11.1. Quantification à un point selon la loi log-logistique à 4 paramètres

Les paramètres (A-D) requis pour le calcul 4PL de la courbe standard et la valeur cible du calibreur, le contrôle positif et le contrôle positif faible sont disponibles dans la fiche technique spécifique au lot jointe à la trousse de test. Ils doivent être comparés aux valeurs indiquées dans le logiciel d'évaluation avant la mesure.

Lors du contrôle qualité final, R-Biopharm AG calcule la courbe standard (y compris les paramètres A-D) dans des conditions de test optimales pour chaque lot de la trousse, ainsi qu'une valeur cible et une plage de concentration admissible pour la DO du calibreur, du contrôle positif et du contrôle positif faible. Le calibreur est aussi testé pour compenser les fluctuations du test et vérifier la qualité de la procédure de test. Le contrôle positif fournit des informations concernant la validité du test.

RIDA®SOFT Win.net calcule le facteur de correction F en interne à partir de la moyenne de la double analyse du calibreur et de sa valeur cible. Ce facteur de correction est ensuite rapproché des absorbances des échantillons de selles. Les résultats du test peuvent être évalués en toute confiance et de manière fiable dans les limites de la courbe standard.

11.2. Quantification à l'aide de la courbe standard

Le test RIDASCREEN® Calprotectin est évalué à l'aide d'une courbe standard qui doit être intégrée dans chaque analyse. Un exemple de courbe standard est fourni dans la fiche technique spécifique à chaque lot.

Pour le contrôle de qualité final, R-Biopharm AG détermine une valeur de référence dans des conditions de test idéales et une plage de concentration admissible pour le contrôle positif et le contrôle positif faible. Le contrôle positif fournit des informations concernant la validité du test lors des quantifications effectuées à l'aide de la courbe standard. Le contrôle positif doit atteindre la plage de concentration spécifiée.

11.3. Résultats du test

À partir d'une valeur seuil > 50 mg/kg de calprotectine humaine dans les selles, le résultat est considéré comme positif. Si les résultats sont inférieurs à la valeur seuil, les échantillons doivent être considérés comme négatifs.

La valeur seuil de 50 mg/kg suggérée pour les adultes peut également être utilisée chez les enfants de 4 à 17 ans.

Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir sa propre plage de valeurs standard.

Remarque : Il est recommandé de renouveler l'analyse des échantillons présentant des concentrations en calprotectine supérieures à 600 mg/kg lors de l'utilisation de l'étalonnage à un point ou de la courbe standard en les diluant davantage (1:5 dans le diluant 3).

Remarque : Il est recommandé de renouveler l'analyse des échantillons dont les valeurs DO sont supérieures à 3,0 lors de l'utilisation de l'étalonnage à un point en les diluant davantage (1:5 dans le diluant 3).

12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Calprotectin permet de dépister les épitopes de la calprotectine humaine dans les échantillons de selles. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur les concentrations en calprotectine obtenues. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux du patient.

13. Performances

13.1. Précision

13.1.1 Précision intra-essai

La précision intra-essai a été déterminée au cours d'une seule analyse utilisant 4 références étudiées en 40 répétitions. Les valeurs DO de ces mesures ont été utilisées pour déterminer les concentrations en calprotectine à l'aide de la courbe standard, à partir de laquelle la valeur moyenne (VM), les écarts-types (ET) et les coefficients de variation (CV) des mesures ont été calculés pour chaque échantillon.

Tableau 3 : Précision intra-essai du test RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibreur			Courbe standard		
	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	CV (%)	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	CV (%)
Référence A	53,8	2,9	5,4	56,6	3,0	5,3
Référence B	96,6	5,5	5,7	102,4	6,3	6,2
Référence C	136,5	5,6	4,1	130,5	5,2	4,0
Référence D	246,7	14,1	5,7	267,6	15,0	5,6

13.1.2 Précision inter-essai

La précision inter-essai a été déterminée par 3 techniciens sur 4 références testées en double, au cours de 20 analyses (2 par jour) menées sur plusieurs jours. Les valeurs DO de ces mesures ont été utilisées pour déterminer les concentrations en calprotectine à l'aide de la courbe standard, à partir de laquelle la valeur moyenne (VM), les écarts-types (ET) et les coefficients de variation (CV) des mesures ont été calculés pour chaque échantillon.

Tableau 4 : Précision inter-essai du test RIDASCREEN® Calprotectin

	Calibreur			Courbe standard		
	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	CV (%)	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	CV (%)
Référence A	55,7	4,3	7,7	57,5	4,1	7,1
Référence B	106,5	7,2	6,8	112,8	8,3	7,3
Référence C	129,6	7,8	6,0	138,5	7,6	5,5
Référence D	260,9	28,3	10,9	284,7	22,7	8,0

13.2. Précision de l'extraction

La précision de l'extraction a été déterminée par 2 techniciens sur 3 échantillons de selles situés au-dessus de la valeur seuil et testés en double au cours de 10 analyses menées sur plusieurs jours (5 jours, 2 passages par jour). Les échantillons ont été extraits et dilués au besoin avant chaque analyse. Les valeurs DO de ces mesures ont été utilisées pour déterminer les concentrations en calprotectine à l'aide de la courbe standard, à partir de laquelle la valeur moyenne (VM), les écarts-types (ET) et les coefficients de variation (CV) des mesures ont été calculés pour chaque échantillon.

Tableau 5 : Précision de l'extraction inter-essai










	Calibreur			Courbe standard		
	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	CV (%)	VM (mg/kg)	ET (mg/kg)	CV (%)
Référence A	64,0	5,0	7,9	67,4	5,0	7,5
Référence B	114,1	10,3	9,0	123,2	10,7	8,7
Référence C	264,0	33,3	12,6	284,8	22,1	7,8

14. Historique des versions


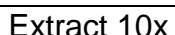
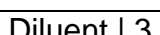
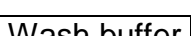
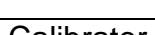
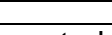
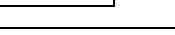
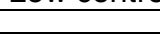
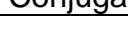

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-07-01	Révision générale 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

	Plaque de microtitrage
	Tampon d'extraction et de dilution
	Tampon de dilution d'échantillon
	Tampon de lavage 10x
	Calibrator
	Contrôle positif
	Contrôle positif faible
	Conjugué
	Substrat
	Réactif stop

16. Bibliographie

1. Arndt et al., 1993, *Crohn; Clin. Lab.* 11: 867-876
2. Stein, J., 1996, 3. *Post-graduiertenkurs der DGVS*
3. Assessment of Crohn's disease activity and alpha 1-antitrypsin in faeces; Arndt B, Schürmann G, Betzler M, Herfarth C, Schmidt-Gayk H.; *Lancet.* 1992 Oct 24; 340(8826):1037.
4. Enteric protein loss in various gastrointestinal diseases determined by intestinal alpha 1-antitrypsin clearance; Karbach U, Ewe K.; *Z Gastroenterol.* 1989 Jul; 27(7):362-5.
5. Detection of increased permeability of the intestinal mucosa in chronic inflammatory bowel diseases; Karbach U.; *Z Gastroenterol Verh.* 1989 Jul; 24:40-4.
6. Alpha 1-antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders; Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS.; *Gastroenterology.* 1990 Nov; 99(5):1380-7.
7. Regulation of alpha1-proteinase inhibitor release by proinflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells; Faust D, Raschke K, Hormann S, Milovic V, Stein J.; *Clin Exp Immunol.* 2002 May; 128(2):279-84.