



BÜHLMANN fCAL[®] ELISA

Calprotectine ELISA

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*

EK-CAL 96 tests

EK-CAL2 192 tests

Date de publication : 2022-11-16
Version A3

 Fabricant

BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Suisse

Tel.: +41 61 487 1212

Fax: +41 61 487 1234

info@buhlmannlabs.ch

UTILISATION PRÉVUE

Le test BÜHLMANN fCAL® ELISA est un test de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative de la calprotectine dans les prélèvements de selles humaines destiné à aider à l'évaluation de l'inflammation de la muqueuse intestinale. Les résultats du dosage peuvent aider au diagnostic différenciant une maladie inflammatoire organique du tractus gastro-intestinal (maladie inflammatoire chronique de l'intestin ou MICI, spécifiquement maladie de Crohn ou rectocolite hémorragique, RCH) d'une maladie fonctionnelle (syndrome du côlon irritable ou SCI) (réf. 1-7), chez les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques et peuvent également aider au suivi d'une MICI (réf. 7-18).

Pour utilisation en laboratoire uniquement.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test BÜHLMANN fCAL® ELISA permet la mesure sélective de la calprotectine dans les extraits de selles par sandwich ELISA. La plaque de microtitration du test BÜHLMANN fCAL® ELISA est revêtue d'un anticorps monoclonal de capture (mAc) hautement spécifique des complexes hétérodimères et polymères de la calprotectine. Les extraits d'échantillons de selles de patients, les contrôles destinés à la détermination de l'acceptabilité des analyses ELISA et les calibrateurs sont chargés dans des puits de la plaque de microtitration. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et des étapes de lavages, un anticorps de détection (Ac) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) détecte les molécules de calprotectine liées à l'anticorps de capture sur la plaque. Après des étapes d'incubation et de lavages supplémentaires, le substrat chromogène, la TMB (tétraméthylbenzidine), est ajouté (formation de la couleur bleue) suivi d'une solution stoppant la réaction (virement de la couleur en jaune). L'absorbance est mesurée à 450 nm. La concentration finale en calprotectine en µg/g dans les échantillons de patients est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage générée à partir des valeurs mesurées des calibrateurs.

RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

| Réactifs | Quantité | | Code | Reconstitution |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| Tampon d'extraction | 3 flacons x 125 mL | 6 flacons x 125 mL | B-CAL-EX | Prêt à l'emploi |
| Plaque de microtitration revêtue d'un mAc anti-calprotectine | 12 barrettes de 8 puits avec cadre | 2 x 12 barrettes de 8 puits avec cadre | B-CAL-MP | Prêt à l'emploi |
| Film adhésif | 3 exem- plaires | 6 exem- plaires | - | Prêt à l'emploi |
| Tampon de lavage concentré 10x avec conservateurs | 1 flacon x 100 mL | 2 flacons x 100 mL | B-CAL-WB | Diluer chaque flacon avec 900 mL de H ₂ O déionisée |

| Réactifs | Quantité | | Code | Reconstitution |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|------------------------------------------|
| | EK-CAL | EK-CAL2 | | |
| Tampon d'incubation avec conservateurs | 2 flacons x 125 mL | 3 flacons x 125 mL | B-CAL-IB | Prêt à l'emploi |
| Calibrateurs A à E^{1) 2)} Calprotectine dérivée de sérum dans une matrice tamponnée avec conservateurs | 5 flacons x 1 mL | 5 flacons x 1 mL | B-CAL-CASET | Prêt à l'emploi |
| Contrôle Haut/ Bas³⁾ Calprotectine dérivée de sérum dans une matrice tamponnée avec conservateurs | 2 flacons x 1 mL | 2 flacons x 1 mL | B-CAL-CONSET | Prêt à l'emploi |
| Marqueur enzymatique Ac anti-calprotectine conjugué à la HRP | 1 flacon x 12 mL | 2 flacons x 12 mL | B-CAL-EL | Prêt à l'emploi |
| Substrat TMB TMB dans un tampon citrate | 1 flacon x 12 mL | 2 flacons x 12 mL | B-TMB12 | Prêt à l'emploi |
| Solution stop acide sulfurique 0,25 M | 1 flacon x 12 mL | 2 flacons x 12 mL | B-ST512 | Prêt à l'emploi Agent corrosif |

Tableau 1

¹⁾ Les concentrations réelles en calprotectine des calibrateurs A à E sont respectivement de 4, 12, 40, 120 et 240 ng/mL. Pour la procédure ELISA dans le domaine des valeurs basses, les valeurs des calibrateurs doivent être établies à : 10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de calprotectine. Cette attribution correspond à la dilution finale au 1:2500e de l'échantillon dans la procédure ELISA dans le domaine des valeurs basses.

²⁾ Si vous choisissez la procédure ELISA étendue, les valeurs nominales des calibrateurs doivent être établies à : 30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de calprotectine. Cette attribution correspond à la dilution finale au 1:7500e de l'échantillon dans la procédure ELISA étendue.

³⁾ Les contrôles contiennent des quantités de calprotectine humaine native spécifiques à chaque lot. Se référer à la fiche additionnelle de QC pour les concentrations réelles.

STOCKAGE ET STABILITÉ DES RÉACTIFS ET DES SOLUTIONS DE TRAVAIL

| Réactifs scellés/non ouverts | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stocker à 2-8 °C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes. | |
| Réactifs ouverts/reconstitués | |
| Tampon d'extraction | Stocker à 2-8 °C jusqu'à 6 mois. |
| Plaque de microtitration | Replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant les sachets de dessiccateur puis refermer soigneusement le joint. Stocker à 2-8 °C jusqu'à 6 mois. |
| Tampon de lavage dilué | Stocker à 2-8 °C jusqu'à 6 mois. |
| Tampon d'incubation | |
| Calibrateurs | |
| Contrôles | |
| Marqueur enzymatique | |
| Substrat TMB | |
| Solution stop | |

Tableau 2

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS SUR DEMANDE

Dispositifs d'extraction de selles

Les dispositifs d'extraction des selles décrits dans le tableau 3 ne sont pas inclus dans le coffret. Les dispositifs d'extraction sélectionnés doivent être commandés séparément.

| Kits de dispositifs d'extraction | Quantité | Code |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| CALEX® Cap | Coffrets de 50, 200 ou 500 tubes disponibles, chaque tube contenant 5 mL de tampon d'extraction Prêt à l'emploi | B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500 |
| Smart-Prep | 50 tubes, spatules et fonds de tube | B-CAL-RD |

Tableau 3

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Procédure d'extraction

- Pipettes de précision de 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables
- Tubes de polystyrène ou de polypropylène jetables pour le transfert des extraits (en option)
- Hotte à flux laminaire
- Vortex multi-tubes/Mélangeur vortex
- Microcentrifugeuse (≥ 3000 x g)
- Centrifugeuse (≥ 500 x g)
- Dispositifs d'extraction (voir le tableau 3 ci-dessus) ou pour la procédure d'extraction manuelle :
 - Anses d'inoculation jetables de 10 µL
 - Tubes de 15 ml en polypropylène avec bouchons à visser requis
 - Balance de précision (10-200 mg)

Procédure ELISA

- Pipettes de précision de 10 µL, 100 µL et 1000 µL avec pointes jetables
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Éprouvette graduée de 1000 mL pour la dilution du tampon de lavage
- Laveur automatique de micro-plaques (voir précautions techniques) ou pissette pour le tampon de lavage
- Agitateur de plaques de microtitration (voir précautions techniques)
- Papier absorbant
- Lecteur de plaques de microtitration pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Règles de sécurité

- Les calibrateurs et les contrôles de ce test contiennent des composants d'origine humaine. Bien qu'ils aient été testés négatifs à l'antigène de surface du VHB, au VHC et aux anticorps du VIH1/2, les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux et conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL), en respectant les précautions appropriées.
- Ce kit contient des composants classés conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 :
chlorhydrate de 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (conc. ≥ 0,0015%), ainsi les réactifs peuvent provoquer des réactions allergiques cutanées (H317).
Acide sulfurique (conc. ≥ 2,5 - < 5%), ainsi les réactifs peuvent provoquer une irritation cutanée (H315) et une irritation oculaire grave (H319).
- Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact accidentel, rincer immédiatement à grande eau pour éviter tout risque d'irritation / brûlures.
- Traiter les réactifs et les produits chimiques comme des déchets dangereux conformément aux lignes directrices ou aux réglementations de sécurité nationales relatives aux substances présentant un risque biologique.

Précautions techniques

Composants du kit

- Le procédé de production entraîne la formation de résidus dans les puits des plaques de microtitration. Ces résidus sont éliminés dans l'étape de lavage (procédure de dosage, étape 3) et n'affectent pas les résultats.
- Les composants ne doivent pas être utilisés après la date de péremption imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger ou utiliser les composants de kits de numéros de lot différents.
- S'assurer impérativement qu'aucune contamination ne se produit entre réactifs, échantillons ou puits.
- Laisser les réactifs s'équilibrer à température ambiante. Mélanger vigoureusement (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les micropuits ne peuvent pas être réutilisés.

Procédure d'extraction manuelle

- Pour obtenir des résultats quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'intégralité des selles ajoutées dans le tampon d'extraction. Toute contamination au sommet du tube d'extraction doit être évitée. Une petite quantité de particules insolubles peut demeurer dans le tube après le mélange.

Procédure ELISA

- Dans la procédure ELISA, les étapes de lavage sont essentielles pour garantir des résultats reproductibles. Laisser le tampon de lavage incuber dans les puits pendant un minimum de 20 secondes avant de le retirer.
- Si un laveur automatique de plaques est utilisé, il est fortement recommandé d'utiliser le « mode plaque », c'est-à-dire que chaque étape du procédé (distribution/aspiration) est mise en œuvre sur toutes les barrettes, séquentiellement, avant que l'instrument ne passe au cycle de lavage suivant. De cette façon, un temps d'incubation minimum est garanti.
- Il est obligatoire de respecter le nombre de cycles de lavages indiqué pour l'obtention de résultats fiables.
- L'agitateur de plaque doit être ajusté à environ 450 rpm (7,5 Hz). Une fréquence de rotation supérieure peut avoir pour conséquence une faible linéarité de dilution pour les valeurs comprises entre 300/900 et 600/1800 µg/g. Un mouvement de rotation est préférable à un mouvement horizontal.
- Pour garantir que la réaction entre l'antigène et l'anticorps soit terminée, le temps d'incubation de l'étape 5 doit être de 30 minutes minimum. Des temps d'incubation modérément supérieurs (jusqu'à 5 minutes) n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- Le marqueur enzymatique est inactivé par l'oxygène et est hautement sensible à l'azide de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux chlorohydrocarbures aromatiques couramment rencontrés dans l'alimentation en eau des laboratoires. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée de qualité élevée.
- Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être générée à chaque fois que le dosage est effectué (pour chaque plaque ou plaque partielle).
- Si la concentration initiale d'un échantillon inconnu est plus élevée que celle du calibrateur le plus concentré, calibrateur E, l'échantillon peut être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure de dosage. Le facteur de dilution résultant doit être pris en compte pour le calcul des résultats.

PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Moins de 1 g d'échantillon primaire de selles est exigé par la procédure d'extraction. Récupérer l'échantillon de selles dans des tubes ordinaires.

Important : l'échantillon doit être collecté sans adjonction de quelque additif chimique ou biologique que ce soit.

Transport des échantillons

Les échantillons de selles doivent être reçus par le laboratoire en charge du traitement dans les 3 jours qui suivent la collecte. Les échantillons de selles peuvent être expédiés à température ambiante ou réfrigérés.

Stockage des échantillons

Les échantillons de selles doivent être réfrigérés à 2-8 °C et extraits dans les 3 jours qui suivent leur réception par le laboratoire. Ne pas stocker les échantillons à des températures supérieures à l'ambiante.

EXTRACTION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES ET STABILITÉ DES EXTRAITS

1. CALEX® Cap

1.1 Procédure d'extraction

Suivre les instructions d'utilisation fournies avec le dispositif CALEX® Cap (Code B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

Dispositif CALEX® Cap : Les échantillons de selles liquides peuvent être directement pipetés dans le dispositif CALEX® Cap. Dévisser le bouchon bleu et pipeter 10 µL d'échantillon de selles dans le dispositif. Reboucher le dispositif CALEX® Cap et passer à l'étape d'homogénéisation au vortex conformément à la procédure d'extraction décrite et illustrée dans les instructions d'utilisation livrées avec le dispositif CALEX® Cap.

Important : Après extraction, centrifuger le dispositif CALEX® Cap pendant 5 minutes à 500-3000 x g avant de poursuivre la procédure de dosage.

1.2 Stabilité des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus avec le dispositif CALEX® Cap sont stables à température ambiante (23 °C) pendant 7 jours et à 2-8 °C jusqu'à 15 jours. Pour un stockage plus long, congeler les extraits à -20 °C. Les extraits congelés sont stables pendant une durée pouvant aller jusqu'à 23 mois.

Les extraits CALEX® Cap peuvent être directement congelés et stockés dans le dispositif CALEX® Cap. Les extraits peuvent être soumis à quatre cycles de congélation-décongélation. Avant la mesure, laisser les extraits congelés s'équilibrer à température ambiante, les mélanger vigoureusement au vortex pendant 10 secondes et centrifuger pendant 5 minutes à 500-3000 x g.

2. Autres dispositifs d'extraction

2.1 Procédures d'extraction

Suivre les instructions d'utilisation fournies avec le dispositif d'extraction correspondant :

- Dispositif d'extraction de selles Roche (code 10745804322) ou BÜHLMANN Smart-Prep (code : B-CAL-RD).

Important : Après extraction à l'aide du dispositif BÜHLMANN Smart-Prep, centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 3000 x g. Alternativement, transférer l'homogénat dans un tube Eppendorf de 2 mL puis centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g. Décanter le surnageant dans un tube neuf étiqueté avant de poursuivre la procédure de dosage.

2.2 Stabilité des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus à l'aide des dispositifs Smart-Prep sont stables à 2-8 °C jusqu'à 7 jours ou à -20 °C pendant 36 mois.

3. Extraction manuelle

3.1 Procédure d'extraction

1. Étiqueter et peser les tubes en polypropylène vide avec l'anse d'inoculation. Noter le poids (tare).

- Prélever 50 à 100 mg d'échantillon de selles au moyen de l'anse d'inoculation et la placer dans le tube pré-pesé avant de repeser celui-ci (poids total). Éviter de prélever les fibres alimentaires présentes dans l'échantillon pendant le processus d'échantillonnage.
- Calculer la quantité nette d'échantillon en soustrayant la tare du poids total, casser l'anse d'inoculation et laisser sa partie inférieure dans le tube.
- Ajouter le tampon d'extraction selon la formule $x \text{ mg de selles} \times 49 = y \text{ } \mu\text{L de tampon d'extraction}$ (par exemple 50 mg de selles + 2450 μL de tampon) dans le tube et refermer celui-ci.
- Extraire les échantillons en
 - Mélangeant vigoureusement au vortex (multitubes) le tube d'extraction contenant le tampon et l'échantillon de selles à la vitesse la plus élevée pendant 30 secondes.
 - Incubant ensuite le tube d'extraction pendant 25 +/- 5 minutes sur un agitateur de plaque à environ 400 rpm. L'anse d'inoculation à l'intérieur du tube sert à améliorer l'agitation.
 - Mélangeant à nouveau vigoureusement au vortex le tube d'extraction pendant 30 secondes.
- Transférer 1,5 mL d'homogénat dans un tube Eppendorf de 2 mL puis centrifuger dans une microcentrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g.
- Décanté le surnageant dans un tube neuf étiqueté avant de poursuivre la procédure de dosage, ou stocker les extraits en se référant à la rubrique Stockage des extraits.

3.2 Stabilité des extraits

Les extraits de calprotectine fécale obtenus par extraction manuelle peuvent être stockés à 2-8 °C pendant 7 jours ou à -20 °C pendant 36 mois.

GAMMES DE TRAVAIL

Le dosage peut être mis en œuvre selon les procédures ELISA à valeurs basses ou étendues. La procédure adaptée doit être choisie en fonction de la concentration en calprotectine attendue :

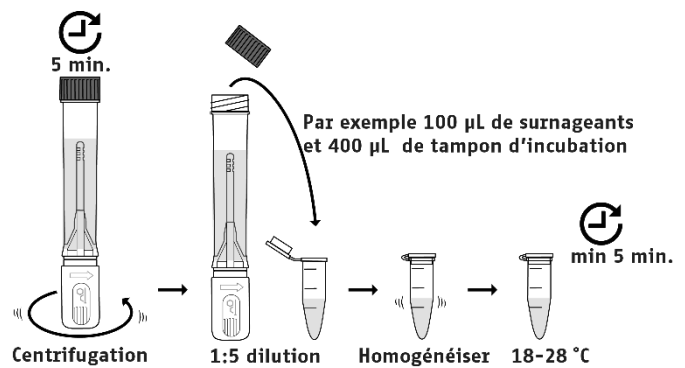
- Pour les échantillons contenant jusqu'à 600 $\mu\text{g/g}$ de calprotectine, choisir la procédure à valeurs basses (gamme de 10-600 $\mu\text{g/g}$).
- Si la concentration des échantillons tend à dépasser 600 $\mu\text{g/g}$, choisir la procédure étendue (gamme de 30-1800 $\mu\text{g/g}$).

PROCEDURE DE DOSAGE

Important : Laisser tous les réactifs s'équilibrer pendant 30 minutes minimum à 18-28 °C avant utilisation. Seuls les extraits de selles doivent être dilués. Les calibrateurs et les contrôles sont prêts à l'emploi.

1. Option de dilution d'échantillon 1 : Gamme 10-600 $\mu\text{g/g}$

- Dispositif CALEX® Cap :** Diluer les extraits de selles au 1:5e avec le tampon d'incubation (par exemple 100 μL d'extrait pour 400 μL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

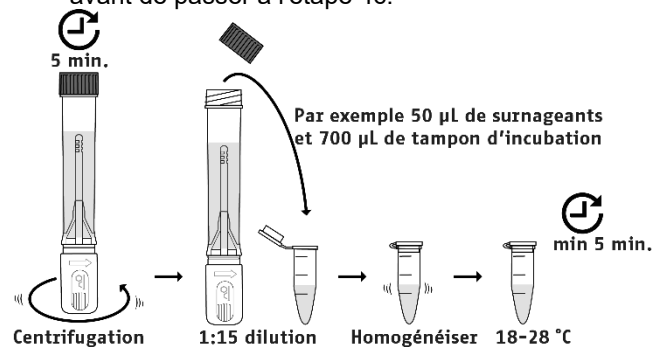


- Extraction manuelle ou Smart-Prep :** Diluer les extraits de selles au 1:50e avec le tampon d'incubation (par exemple 20 μL d'extrait pour 980 μL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

1. Option de dilution d'échantillon 2 : Gamme 30-1800 $\mu\text{g/g}$

La gamme de dosage peut être étendue d'un facteur 3 en diluant les échantillons au 1:7500e au lieu du 1:2500e. Cette procédure est recommandée lorsque des concentrations élevées en calprotectine sont attendues.

- Dispositif CALEX® Cap :** Diluer les extraits de selles au 1:15e avec le tampon d'incubation (par exemple 50 μL d'extrait pour 700 μL de tampon d'incubation). Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

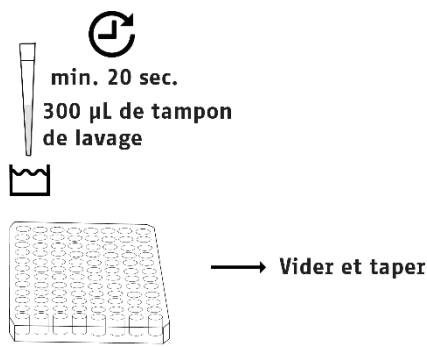


- Extraction manuelle ou Smart-Prep :** Diluer les extraits de selles au 1:150e avec le tampon d'incubation, en utilisant par exemple 20 μL d'extrait pour 2980 μL de tampon d'incubation. Mélanger vigoureusement. Laisser les échantillons s'équilibrer pendant au moins 5 minutes à 18-28 °C avant de passer à l'étape 4c.

- Préparer un cadre de plaque avec suffisamment de barrettes pour tester le nombre requis de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dilués. Retirer les barrettes en surplus du cadre et les placer immédiatement dans la pochette prévue à cet effet avec les sachets de dessiccateur. Conserver au réfrigérateur.

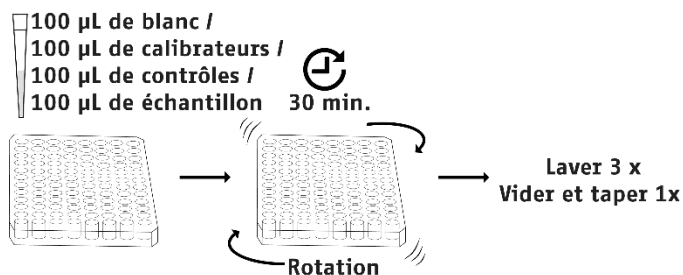
- Laver deux fois les puits coatés avec minimum 300 μL de tampon de lavage par puits. Vider les puits et taper énergiquement la plaque sur du papier absorbant.

Important : Laisser le tampon de lavage dans les puits pendant un minimum de 20 secondes à chaque étape de lavage.

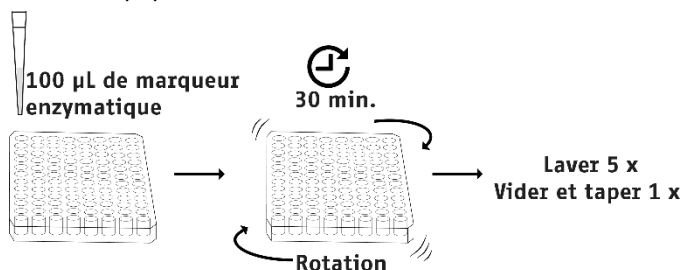


Laver 2 x

- 4a. Pipeter 100 µL de tampon d'incubation (blanc) et Pipeter 100 µL des calibrateurs A-E dans les puits correspondants.
- 4b. Pipeter 100 µL des contrôles haut et bas dans les puits correspondants.
- 4c. Pipeter 100 µL de chaque échantillon dilué en double dans les puits suivants.
5. Couvrir la plaque à l'aide d'un film adhésif et incuber pendant 30 + 5 minutes maximum sur un agitateur de plaque réglé à environ 450 rpm à 18-28 °C (voir précautions techniques – procédure ELISA).
6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider les puits puis les laver trois fois, avec au moins 300 µL de tampon de lavage par puits (voir précautions techniques – procédure ELISA). Vider les puits et taper énergiquement la plaque sur du papier absorbant

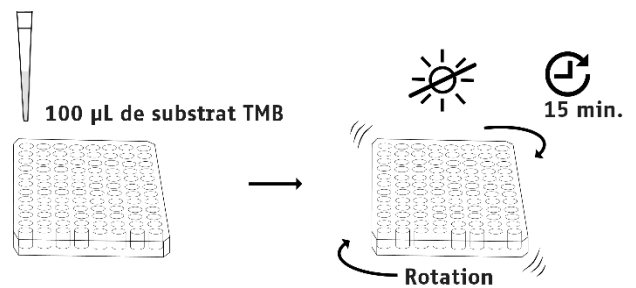


7. Pipeter 100 µL de marqueur enzymatique dans tous les puits.
8. Couvrir la plaque d'un film adhésif et incuber pendant 30 ± 5 min sur un agitateur de plaque réglé à environ 450 rpm à 18-28 °C.
9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider les puits et les laver cinq fois avec au moins 300 µL de tampon de lavage par puits. Vider les puits et taper énergiquement la plaque sur du papier absorbant.



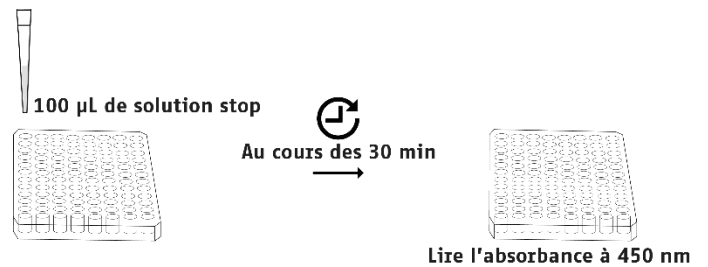
Important : Laisser le substrat TMB s'équilibrer à 18-28 °C.

10. Pipeter 100 µL de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
11. Couvrir la plaque d'un film adhésif, protéger la plaque de la lumière directe et incuber pendant 15 ± 2 min sur un agitateur de plaque réglé à environ 450 rpm à 18-28 °C.



12. Pipeter 100 µL de solution stop dans tous les puits. Retirer les bulles d'air avec une pointe de pipette. Passer à l'étape 13 dans les 30 minutes qui suivent.

13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.



CONTRÔLE DE QUALITÉ

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis et en suivant fidèlement les présentes instructions d'utilisation.

Le coffret BÜHLMANN fCAL® ELISA est livré avec deux contrôles, haut et bas. Les valeurs de référence correspondantes aux contrôles sont indiquées dans la fiche de données de contrôle qualité (QC) fournie dans chaque coffret. Les valeurs et les plages d'acceptabilité indiquées dans la fiche de données QC se réfèrent toujours au lot actuel et doivent être utilisées pour la comparaison directe des résultats. Si les résultats des contrôles haut et/ou bas sont hors gamme indiquée dans la fiche de données QC, il est recommandé de considérer l'ensemble de la série comme invalide.

Il est recommandé d'utiliser des échantillons de contrôle interne, en plus des contrôles du kit, en fonction des réglementations locales et nationales. L'utilisation d'échantillons de contrôle interne est conseillée pour garantir la validité des résultats d'un jour à l'autre. Comme il n'existe pas de contrôle commercial pour la calprotectine fécale, nous recommandons l'utilisation d'un pool d'extraits de selles avec des niveaux normaux et pathologiques pour le contrôle qualité interne.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs de contrôles doit se situer dans les limites d'acceptabilité établies par le laboratoire. Si les performances du dosage ne répondent pas aux limites établies et que la répétition a exclu les erreurs de technique, contrôler les problèmes suivants : i) dispositifs de pipetage, de régulation de température et de chronométrage ; ii) réglages du lecteur ELISA ; iii) dates de péremption des réactifs ; iv) conditions de stockage et d'incubation ; v) la solution de substrat TMB doit être incolore ; vi) pureté de l'eau ; vii) méthodes d'aspiration et de lavage.

STANDARDISATION ET TRAÇABILITE METROLOGIQUE

Il n'existe pas de substances de référence ou de procédures de mesure de référence reconnues au niveau national ou

international pour l'analyte calprotectine dans des prélèvements de selles. Les valeurs des calibrateurs BÜHLMANN fCAL® ELISA ont été attribuées par de multiples séries de mesure en utilisant un matériel de référence interne à base de sérum humain et le protocole du test BÜHLMANN fCAL® ELISA. La concentration en calprotectine du matériel de référence interne a été établie en utilisant du MRP8/14 purifié à partir de granulocytes humains en tant que matériel de référence primaire.

L'intervalle de confiance à 95% de l'incertitude combinée des calibrateurs de produit a été déterminé comme étant inférieur à 13,3%, et celui de l'incertitude combinée des contrôles de produit comme étant inférieur à 16,4%.

CALCUL DES RÉSULTATS DU TEST

Courbe d'étalonnage

Il est recommandé d'utiliser un logiciel capable d'effectuer les calculs suivants : soustraction de la valeur de DO du blanc de chaque puits de calibrateur pour calculer la valeur de calibrateur. Établir une courbe d'étalonnage en utilisant un ajustement logarithmique à 4 paramètres (4 PL).

Contrôles et échantillons

Il est recommandé d'utiliser un logiciel capable d'effectuer les calculs suivants : soustraction de la valeur de DO du blanc de chaque puits de contrôle/échantillon. Calculer la concentration en calprotectine du contrôle/de l'échantillon dans chaque puits, en µg/g, en utilisant la courbe d'étalonnage établie.

Gamme 10-600 µg/g

Si vous sélectionnez la procédure ELISA dans le domaine des valeurs basses, les concentrations des calibrateurs doivent être établies à : 10, 30, 100, 300 et 600 µg/g de calprotectine. Les résultats doivent être multipliés par les facteurs de dilution supplémentaires (si une dilution finale différente du 1:2500^e a été réalisée) pour obtenir les résultats finaux.

Des exemples classiques sont reportés dans le tableau 12 (résultats) et la figure 1 (courbe d'étalonnage). Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'échantillons à doser.

Gamme 30-1800 µg/g

Si vous choisissez la procédure ELISA étendue, les valeurs nominales des calibrateurs doivent être établies à : 30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de calprotectine. Les résultats doivent être multipliés par les facteurs de dilution supplémentaires (si une dilution finale différente de 1:7500^e a été réalisée) pour obtenir les résultats finaux.

Des exemples classiques sont reportés dans le tableau 15 (résultats) et la figure 3 (courbe d'étalonnage). Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'échantillons à doser.

LIMITES

- Les réactifs fournis avec le coffret BÜHLMANN fCAL® ELISA sont exclusivement destinés à la détermination du niveau de calprotectine dans des échantillons de selles humaines.
- Les résultats des tests doivent être interprétés en conjonction avec les informations issues de l'évaluation clinique du patient et des autres procédures diagnostiques.

- Pour le suivi des MICI, il a été suggéré que de multiples mesures de la calprotectine fécale réalisées à des intervalles pouvant aller jusqu'à 4 semaines permettent d'obtenir la meilleure précision diagnostique dans la prédiction de la rechute clinique des patients (réf. 19-20).
- Les résultats peuvent ne pas être cliniquement applicables aux enfants de moins de 4 ans dont les niveaux de calprotectine sont légèrement supérieurs à la normale (réf. 21-24).
- Certains patients prenant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) présenteront des niveaux de calprotectine fécale supérieurs.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

I. Différenciation entre maladie organique et maladie gastro-intestinale fonctionnelle

Les catégories de résultats se basent sur les données d'études cliniques mises en œuvre par BÜHLMANN et constituent des recommandations de BÜHLMANN. Tous les résultats de test doivent être interprétés en conjonction avec les informations obtenues à partir des symptômes cliniques du patient, ses antécédents médicaux et les autres résultats cliniques et biologiques :

Valeurs seuils cliniques

Les résultats provenant de 58 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour un SCI et de 131 échantillons cliniques de patients diagnostiqués pour une MICI, provenant d'une étude clinique internationale, ont été analysés pour obtenir les valeurs décrites dans le tableau 4.

| Concentration en calprotectine | Interprétation | Suite |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| < 80 µg/g | Normale | Aucune |
| 80 – 160 µg/g | Zone grise/frontière | Suite dans les 4 à 6 semaines |
| > 160 µg/g | Supérieure à la normale | Répéter le cas échéant |

Tableau 4

Valeurs de calprotectine inférieures à 80 µg/g

Des valeurs de calprotectine fécale < 80 µg/g n'indiquent pas d'inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est peu probable que les patients présentant de faibles niveaux de calprotectine nécessitent des procédures invasives visant à déterminer la cause de l'inflammation.

Valeurs de calprotectine comprises entre 80 et 160 µg/g (bornes incluses)

Des niveaux de calprotectine fécale moyens, compris entre 80 et 160 µg/g, bornes incluses, également qualifiés de niveaux dans la zone grise, ne sont pas directement révélateurs d'une inflammation active exigeant un suivi thérapeutique immédiat par des tests invasifs. Cependant, la présence d'une inflammation ne peut pas être exclue. Il est recommandé de réévaluer les niveaux de calprotectine fécale après 4 à 6 semaines pour déterminer l'état d'inflammation.

Valeurs de calprotectine supérieures à 160 µg/g

Des valeurs de calprotectine fécale supérieures à 160 µg/g indiquent une infiltration de neutrophiles dans le tractus gastro-intestinal ; ceci peut signaler la présence d'une maladie inflammatoire active. Des procédures de recherche supplémentaires et appropriées menées par des spécialistes sont suggérées pour obtenir un diagnostic clinique global.

Évaluation clinique

La capacité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA à différencier les patients atteints de MICI des autres troubles gastro-intestinaux non inflammatoires, y compris le SCI, a été testée dans une étude clinique avec un total de 337 patients adultes et pédiatriques. Cent trente-cinq patients (135) présentaient un diagnostic final de MICI (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique ou colite indéterminée), 130 patients souffraient de SCI et 72 patients présentaient des douleurs abdominales et/ou des diarrhées, ou d'autres états non inflammatoires liés au tractus gastro-intestinal (voir tableau 5). Le diagnostic final était étayé par des résultats endoscopiques ainsi que d'autres résultats cliniques.

Une sensibilité clinique de 93,3 % à 80 µg/g et une spécificité clinique de 83,7 % à 160 µg/g peuvent être atteinte dans la différenciation entre MICI et les autres troubles gastro-intestinaux non inflammatoires, y compris le SCI. L'analyse de la courbe ROC permet d'obtenir une AUC de 0,923 (voir tableau 6).

Une sensibilité clinique de 93,3 % à 80 µg/g et une spécificité clinique de 85,4% à 160 µg/g peuvent être atteinte dans la différenciation entre MICI et le SCI. L'analyse de la courbe ROC permet d'obtenir une AUC de 0,933 (voir tableau 8).

La combinaison optimale des seuils pour ces pools de patients a pu être définie par analyse de la fonction d'efficacité du récepteur (courbe ROC) à 80 µg/g et 160 µg/g de calprotectine, ce qui est légèrement plus restrictif que la combinaison **du seuil bas plus sensible de 50 µg/g** mais avec une performance de spécificité inférieure, et **du seuil haut de 200 µg/g** de sensibilité légèrement inférieure (tableaux 7 et 9).

II. Suivi des MICI

Seuils cliniques et évaluation

Le dosage de la calprotectine fécale constitue un moyen simple et fiable d'aider au suivi des patients atteints de MICI (réf. 7-18).

La corrélation entre les niveaux de calprotectine et l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale du patient, évalué par endoscopie, a été déterminée dans trois études indépendantes utilisant les tests de calprotectine BÜHLMANN (tableau 10). La valeur diagnostique de la calprotectine dans la prédiction de la rémission et de la rechute cliniques, en fonction des symptômes du patient, des indices d'activité clinique, du recours non planifié à une intensification thérapeutique, une hospitalisation ou une intervention d'urgence, a été déterminée dans trois études utilisant les tests de calprotectine BÜHLMANN (tableau 11). Les catégories de résultats indiquées sont des recommandations ; elles sont établies en condensant les connaissances des études publiées sur les seuils et performances cliniques. Il est recommandé aux praticiens de santé d'établir des seuils individuels pour chaque patient en déterminant le niveau "basal" de calprotectine du patient pendant les périodes de rémission.

Valeurs de calprotectine inférieures à 100 µg/g

Des niveaux de calprotectine fécale en dessous de 100 µg/g peuvent indiquer de façon fiable des patients à faible risque de rechute clinique, en rémission endoscopique pour lesquels des procédures endoscopiques invasives peuvent être évitées (réf. 7-18).

Valeurs de calprotectine comprises entre 100 et 300 µg/g

Des niveaux de calprotectine fécale entre 100 et 300 µg/g peuvent indiquer la nécessité d'un contrôle plus rapproché dans la période suivante pour évaluer les tendances d'évolution de la maladie.

Valeurs de calprotectine supérieures à 300 µg/g

En cas de niveau de calprotectine fécale supérieur à 300 µg/g, la mesure doit être répétée, et si ces niveaux élevés sont confirmés, des procédures d'investigation supplémentaires doivent être mises en œuvre (réf. 7-18).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques des performances du test BÜHLMANN fCAL® ELISA ont été établies en utilisant la méthode d'extraction manuelle, à moins que le contraire ne soit précisé.

Gamme de dosage : 10-600 µg/g

Répétabilité (précision intra-dosage) : 1,9 - 8,0% CV

Précision intra-laboratoire : 5,5 - 14,0% CV

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies conformément à la ligne directrice EP05-A2 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 22 jours x 2 réplicats. Dix extraits de prélèvements de selles avec des concentrations en calprotectine comprises entre 13,2 et 501,4 µg/g ont été testés (tableau 13).

Limite de détection (LD) : 4,2 µg/g

La LD a été établie conformément à la ligne directrice EP17-A du CLSI et avec des proportions de faux positifs (α) inférieure à 5 % et de faux négatifs (β) inférieure à 5 % en se basant sur 240 déterminations, avec 80 blancs (tampon d'extraction) et 160 réplicats de faible niveau ; et une **LB de 0,29 µg/g**.

Limite de quantification (LQ) : 9,8 µg/g

La LQ a été établie en utilisant des données obtenues dans l'étude de précision intra-laboratoire, en incluant un échantillon de selles supplémentaire avec une concentration de 7,4 µg/g. La LQ a été déterminée comme étant la concentration en calprotectine à laquelle l'ajustement non linéaire des données de précision totale croise l'objectif de précision de 20% de CV.

Linéarité : 10 - 600 µg/g

La linéarité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA a été déterminée conformément à la ligne directrice EP06-A du CLSI. Un écart maximal avec la linéarité de $\pm 20\%$ était autorisé. Pour les valeurs inférieures à 75 µg/g, une différence absolue de moins de $\pm 15 \mu\text{g/g}$ était autorisée (tableau 14).

Exactitude/Récupération

Biais total : -1,1% ;

Limite de concordance inférieure : -17,5%,

Limite de concordance supérieure : 15,4%

Quatre échantillons de selles extraites négatifs ont été additionnés de quantités croissantes de calprotectine issues de prélèvements de sérum. Les résultats sont présentés sur la figure 2.

« Effet crochet » à dose élevée

Les échantillons de concentration théorique pouvant atteindre 60 000 µg/g peuvent être dosés sans limiter la gamme de mesure du dosage.

Gamme de dosage : 30-1800 µg/g

Répétabilité (précision intra-dosage) : 1,7 - 5,8% CV

Précision intra-laboratoire : 3,1 - 9,4% CV

La répétabilité et la précision intra-laboratoire ont été établies conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 10 jours x 2 analyses x 4 réplicats. Sept extraits de prélèvements de selles regroupés avec des concentrations en calprotectine comprises entre 38,5 et 918,0 µg/g ont été testés (tableau 16).

Précision entre lots : 4,2 - 9,7% CV

La précision entre lots a été établie conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 3 lots x 5 jours x 5 réplicats et un modèle des composantes de la variance à effets aléatoires. Six extraits de prélèvements de selles avec des concentrations en calprotectine comprises entre 46,4 et 1476,1 µg/g ont été testés (tableau 17).

Reproductibilité (étude d'évaluation de précision multisite) : 6,4 - 19,0% CV

La reproductibilité a été établie conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 3 sites de laboratoire x 2 opérateurs x 5 jours x 2 analyses par jour x 4 réplicats. Trois lots de réactifs ont été utilisés dans l'étude. Cinq extraits de prélèvements de selles regroupés avec des concentrations en calprotectine comprises entre 42,1 et 1053,3 µg/g ont été testés (tableau 18).

Limite de détection (LD) : 12,6 µg/g

La LD a été établie conformément à la ligne directrice EP17-A2 du CLSI et avec des proportions de faux positifs (α) inférieure à 5% et de faux négatifs (β) inférieure à 5% en se basant sur 120 déterminations, avec 60 blancs (Tampon d'extraction) et 60 réplicats de faible niveau ; et une **LB de 8,3 µg/g**.

Limite de quantification (LQ) : 21,3 µg/g

La LQ a été établie conformément à la ligne directrice EP17-A2 du CLSI en se basant sur 60 déterminations et un objectif de précision de 20% CV.

Linéarité : 30 - 1800 µg/g

La linéarité du test BÜHLMANN fCAL® ELISA a été déterminée conformément à la ligne directrice EP06-A du CLSI. Un écart maximal avec la linéarité de $\pm 20\%$ était autorisé. Pour les valeurs inférieures à 75 µg/g, une différence absolue de moins de ± 15 µg/g était autorisée (tableau 19).

Exactitude / Récupération : 96,4 - 102,2%

Sept extraits de prélèvements de selles avec des niveaux de calprotectine compris entre 46,5 et 990,2 µg/g ont été complétés par du matériel de calibration contenant de la calprotectine à la concentration de 180 µg/g. Le complément a été réalisé à hauteur de 10% du volume d'extrait d'échantillon. Les échantillons « de ligne de base » ont été additionnés du volume correspondant de tampon d'incubation. Les échantillons « de ligne de base » et « de ligne de base + complément » ont été mesurés en trois réplicats (tableau 20).

Pré-analyse

Les caractéristiques de performance du test BÜHLMANN fCAL® ELISA en ce qui concerne les procédures pré-analytiques ont été établies dans la gamme de fonctionnement 30 – 1800 µg/g.

Reproductibilité de l'extraction – extraction manuelle : 9,5 - 20,5%

La reproductibilité de l'extraction a été établie conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 10 extractions x 2 réplicats. Neuf prélèvements de selles cliniques, y compris des prélèvements de consistance solide, semi-solide et liquide, avec des concentrations en calprotectine comprises entre 51,2 et 1783,7 µg/g, ont été testés (tableau 21).

Reproductibilité de l'extraction – CALEX® Cap : 7,9 - 16,9%

La reproductibilité de l'extraction a été établie conformément à la ligne directrice EP05-A3 du CLSI en utilisant un modèle d'étude de 3 lots de CALEX® Cap x 4 extractions x 4 réplicats. Cinq prélèvements de selles cliniques, y compris des prélèvements de consistance solide, semi-solide et liquide, avec des concentrations en calprotectine comprises entre 42,5 et 2949,9 µg/g, ont été testés (tableau 22).

Comparaison des méthodes CALEX® Cap contre extraction manuelle

Biais à 80 µg/g : 5,9% (IC à 95% : 1,4 - 12,2%)

Biais à 160 µg/g : 12,0% (IC à 95% : 7,8 - 17,0%)

Biais moyen : 10,1% (IC à 95% : 5,7 - 14,5%)

L'étude de comparaison des méthodes a été réalisée conformément à la ligne directrice EP09-A3 du CLSI. Deux cent quarante et un (241) prélèvements de selles cliniques ont été extraits en utilisant un lot de dispositif CALEX® Cap. Les valeurs de référence, avec un intervalle de concentration en calprotectine finale de 30,5 à 1496,6 µg/g ont été établies en utilisant la méthode d'extraction manuelle. Les extraits ont été mesurés par des déterminations uniques dans les deux méthodes. Le biais a été déterminé en utilisant une régression linéaire de Passing-Bablok et une analyse de Bland-Altman (tableaux 23 et 24).

SUBSTANCES INTERFERENTES

La sensibilité du dosage BÜHLMANN fCAL® ELISA aux produits pharmaceutiques oraux, aux suppléments nutritionnels, à l'hémoglobine ainsi qu'aux micro-organismes entéropathologiques a été évaluée en suivant la ligne directrice EP07-A2 du CLSI, en utilisant la gamme de mesure étendue. Un biais dans les résultats dépassant 10% a été considéré comme une interférence. Aucune interférence n'a été détectée avec les substances répertoriées dans le tableau 25 jusqu'aux concentrations indiquées. Aucune interférence n'a été détectée avec les micro-organismes entéropathologiques répertoriés dans le tableau 26 jusqu'aux quantités indiquées d'unités formant colonie (UFC) par mL d'extrait de prélèvement de selles.

TABLEAUX ET FIGURES

Études cliniques

Étude clinique – différenciation entre maladie organique et maladie gastro-intestinale fonctionnelle

| Diagnostic final | Distribution des résultats patients en nombre (pourcentages) dans les intervalles diagnostiques du test BÜHLMANN fCAL® ELISA. | | | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|------------|
| | < 80 µg/g | 80 - 160 µg/g | > 160 µg/g | Total |
| MICI | 9 (6,7%) | 12 (8,9%) | 114 (84,4%) | 135 (100%) |
| SCI | 94 (72,3%) | 17 (13,1%) | 19 (14,6%) | 130 (100%) |
| Autres troubles GI | 48 (66,7%) | 10 (13,9%) | 14 (19,4%) | 72 (100%) |

Tableau 5

| MICI vs. non MICI | Point de décision clinique | |
|------------------------|----------------------------|----------------------|
| | 80 µg/g | 160 µg/g |
| Sensibilité (IC à 95%) | 93,3% (87,7%, 96,9%) | 84,4% (77,2%, 90,1%) |
| Spécificité (IC à 95%) | 70,3% (63,5%, 76,5%) | 83,7% (77,8%, 88,5%) |
| VPP (IC à 95%) | 67,7% (60,5%, 74,4%) | 77,6% (69,9%, 84,0%) |
| VPN (IC à 95%) | 94,0% (89,0%, 97,2%) | 88,9% (83,6%, 93,0%) |
| AUC ROC (IC à 95%) | 0,923 (0,893, 0,953) | |

Tableau 6

| MICI vs. non MICI | Point de décision clinique | |
|------------------------|----------------------------|----------------------|
| | 50 µg/g | 200 µg/g |
| Sensibilité (IC à 95%) | 96,3% (91,6%, 98,8%) | 80,7% (73,1%, 87,0%) |
| Spécificité (IC à 95%) | 59,9% (52,8%, 66,7%) | 87,1% (81,7%, 91,4%) |
| VPP (IC à 95%) | 61,6% (54,7%, 68,2%) | 80,7% (73,1%, 87,0%) |
| VPN (IC à 95%) | 96,0% (91,0%, 98,7%) | 87,1% (81,7%, 91,4%) |

Tableau 7

| MICI vs. SCI | Point de décision clinique | |
|------------------------|----------------------------|----------------------|
| | 80 µg/g | 160 µg/g |
| Sensibilité (IC à 95%) | 93,3% (87,7%, 96,9%) | 84,4% (77,2%, 90,1%) |
| Spécificité (IC à 95%) | 72,3% (63,8%, 79,8%) | 85,4% (78,1%, 91,0%) |
| VPP (IC à 95%) | 77,8% (70,6%, 83,9%) | 85,7% (78,6%, 91,2%) |
| VPN (IC à 95%) | 91,3% (84,1%, 95,9%) | 84,1% (76,7%, 89,9%) |
| AUC ROC (IC à 95%) | 0,933 (0,902, 0,963) | |

Tableau 8

| MICI vs. SCI | Point de décision clinique | |
|------------------------|----------------------------|----------------------|
| | 50 µg/g | 200 µg/g |
| Sensibilité (IC à 95%) | 96,3% (91,6%, 98,8%) | 80,7% (73,1%, 87,0%) |
| Spécificité (IC à 95%) | 59,2% (50,3%, 67,8%) | 90,0% (83,5%, 94,6%) |
| VPP (IC à 95%) | 71,0% (63,9%, 77,5%) | 89,3% (82,5%, 94,2%) |
| VPN (IC à 95%) | 93,9% (86,3%, 98,0%) | 81,8% (74,5%, 87,8%) |

Tableau 9

non MICI – SCI + autres troubles GI

IC – intervalle de confiance

VPP – valeur prédictive positive

VPN – valeur prédictive négative

AUC ROC – Aire sous la courbe de l'analyse ROC (fonction d'efficacité du récepteur)

Études cliniques – Suivi des MICI

| Calprotectine ¹ en fonction de l'activité des MICI déterminée par endoscopie | Étude 1 Espagne (réf. 9) | Étude 2 Espagne (réf. 10) | Australie, Nouvelle-Zélande (réf. 11) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Nombre et distribution démographique des patients | 89 (MC ²) Âges: 32-58 44% d'hommes | 123 (RCH ³) Âges: 18-85 66,4% d'hommes | 99 (MC ² après résection) Âges: 29-47 46,5% d'hommes |
| Seuil | 272 µg/g | 280 µg/g | 100 µg/g |
| VPN | 98% | 86% | 91% |
| VPP | 76% | 80,3% | 53% |

Tableau 10

¹ Étude 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL et Quantum Blue® fCAL high range
Étude 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² MC = patients atteints de la maladie de Crohn

³ RCH = patients atteints de rectocolite hémorragique

Études cliniques – Suivi des MICI

| Calprotectine ¹ en fonction de la rémission ou de la rechute cliniques future | Étude 4 Royaume-Uni (ref. 12) | Étude 5 Espagne (ref. 13) | Étude 6 Espagne (ref. 14) |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nombre et distribution démographique des patients | 92 (MC ²) 38% d'hommes | 30 (MC ²) thérapie par infliximab adalimumab Âges: 24-64 43,3% d'hommes | 33 (MC ²) 20 (RCH ³) thérapie par infliximab Âges: 18-68 47,2% d'hommes |
| Suivi thérapeutique après la mesure de la calprotectine | 12 mois | 4 mois | 12 mois |
| Patients en rechute clinique après suivi | 11% | 30% | 23% |
| Seuil | 240 µg/g | 204 µg/g | 160 µg/g |
| VPN | 96,8% | 100% | 96,1% |
| VPP | 27,6% | 75% | 68,7% |

Tableau 11

¹ Étude 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Étude 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL et Quantum Blue® fCAL high range

² MC = patients atteints de la maladie de Crohn

³ RCH = patients atteints de rectocolite hémorragique

TABLEAUX ET FIGURES

PROCEDURE POUR LA GAMME INFERIEURE 10-600 µg/g

Exemple de résultats

| | Conc. [µg/g] | Absorb. [OD] | Calc. Conc. [µg/g] | CV Conc [%] |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------------|-------------|
| Blanc moy. | | 0,096 | | |
| Cal A | 10 | 0,073 | | |
| Cal A | 10 | 0,066 | | |
| Cal A moy. | 10 | 0,069 | | 7,2 |
| Cal B | 30 | 0,143 | | |
| Cal B | 30 | 0,153 | | |
| Cal B moy. | 30 | 0,148 | | 4,8 |
| Cal C | 100 | 0,465 | | |
| Cal C | 100 | 0,456 | | |
| Cal C moy. | 100 | 0,460 | | 1,4 |
| Cal D | 300 | 1,121 | | |
| Cal D | 300 | 1,135 | | |
| Cal D moy. | 300 | 1,128 | | 0,9 |
| Cal E | 600 | 1,658 | | |
| Cal E | 600 | 1,671 | | |
| Cal E moy. | 600 | 1,664 | | 0,6 |
| Ctrl Low | | 0,201 | 41 | |
| Ctrl Low | | 0,189 | 39 | |
| Ctrl Low moy. | | 0,195 | 40 | 4,4 |
| Ctrl High | | 0,598 | 134 | |
| Ctrl High | | 0,583 | 130 | |
| Ctrl High moy. | | 0,590 | 132 | 1,8 |

Tableau 12

Exemple d'une courbe de calibration

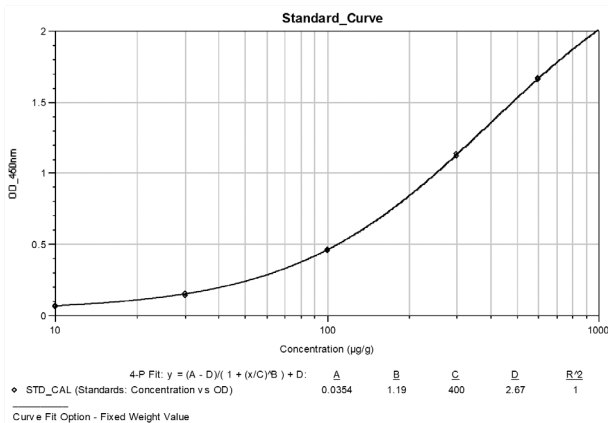


Figure 1

Précision intra-laboratoire

| Échanti llo No. | n | Moyen- ne [µg/g] | Répétabilité | | Jour-à-jour | | Précision totale | |
|--------------------|----|------------------------|--------------|------|-------------|-------|---------------------|-------|
| | | | 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% |

Tableau 13

Linéarité

| ID | Gamme de mesure testée | R ² | valeur p pour le coefficient non linéaire | Plage linéaire |
|----|---------------------------|----------------|----------------------------------------------------|----------------|
| 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 |

Tableau 14

Récupération d'addition

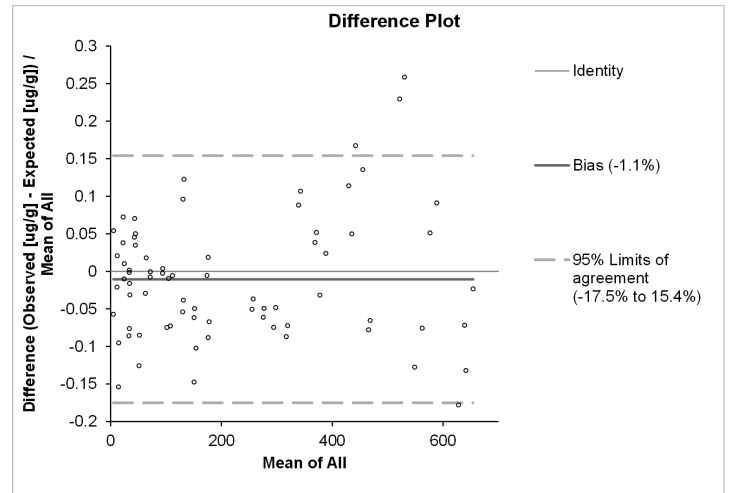


Figure 2

TABLEAUX ET FIGURES

PROCÉDURE POUR LA GAMME ÉTENDUE 30-1800 µg/g

Exemple de résultats

| | Concentration [µg/g] | Absorb. [OD] |
|--------------------|----------------------|--------------|
| Calibrateur A | 30 | 0,047 |
| | 30 | 0,046 |
| Calibrateur B | 90 | 0,138 |
| | 90 | 0,140 |
| Calibrateur C | 300 | 0,464 |
| | 300 | 0,452 |
| Calibrateur D | 900 | 1,207 |
| | 900 | 1,192 |
| Calibrateur E | 1800 | 1,627 |
| | 1800 | 1,630 |
| Blanc moy. | | 0,057 |
| | | |
| Contrôle inférieur | | 0,147 |
| | | 0,162 |
| Contrôle supérieur | | 0,618 |
| | | 0,618 |

Tableau 15

Exemple d'une courbe standard

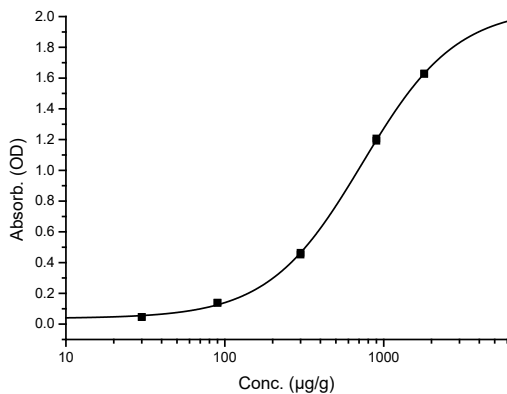


Figure 3

Précision intra-laboratoire

| ID | Moyenne [µg/g] | n | Répétabilité | | Entre analyses | | Jour-à-jour | | Intra-laboratoire | |
|----|----------------|----|--------------|------|----------------|------|-------------|------|-------------------|------|
| | | | 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% |

Tableau 16

Précision entre lots

| ID | Moyenne [µg/g] | n | Intra-analyse | | Jour-à-jour | | Entre lots | | 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% |

Tableau 17

Reproductibilité - étude d'évaluation de précision multisite

| ID | Moyenne [µg/g] | n | Entre opérateurs | | Entre sites | | Total (Reproductibilité) | |
|-----|----------------|-----|------------------|------|-------------|-------|--------------------------|-------|
| | | | 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% |

Tableau 18

Linéarité

| ID | Gamme de mesure testée [µg/g] | R ² | valeur p pour le coefficient linéaire | Plage linéaire [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 |

Tableau 19

Exactitude / Récupération

| ID | Valeur moyenne de base [µg/g] | Valeur attendue de base + complément [µg/g] | Valeur observée de base + complément [µg/g] | Taux de récupération [%] |
|----|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|
| #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% |

Tableau 20

TABLEAUX ET FIGURES

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Reproductibilité de l'extraction – extraction à manuelle par pesée

| ID | Moyenne [µg/g] | n | Intra-extraction | | Entre-extractions | | Précision totale | |
|-----|-------------------|----|------------------|-------|-------------------|-------|------------------|-------|
| | | | 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% |

Tableau 21

Reproductibilité de l'extraction – CALEX® Cap

| ID | Moyenne [µg/g] | Intra-extraction | | Entre-extractions | | Entre lots | | Précision totale | |
|----|-------------------|------------------|------|-------------------|-------|------------|------|------------------|-------|
| | | 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% |

Tableau 22

Comparaison des méthodes – extraction CALEX® Cap et extraction manuelle

| Analyse de Bland-Altman | | |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Biais moyen (95%) | LdA inférieure (IC à 95%) | LdA supérieure (IC à 95%) |
| 10,1% (5,7%, 14,5%) | -47,4% (-54,9%, -39,8%) | 67,5% (60,1%, 75,1%) |

Tableau 23

| Analyse par régression de Passing-Bablok | | | | |
|------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|
| Pente (IC à 95%) | Ordonnée à l'origine (µg/g) (IC à 95%) | Biais à 80 µg/g (IC à 95%) | Biais à 160 µg/g (IC à 95%) | r |
| 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 |

Tableau 24

SUBSTANCES INTERFERENTES

Médicaments oraux, compléments nutritionnels et hémoglobine

| Nom commercial | Principe actif | Concentration en mg/ 50 mg de selles |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| gyno-Tardyféron | Sulfate de fer (II) (contient 0,35 mg d'acide folique) | 0,11 |
| Prednisone | Prednisone | 0,31 |
| Imurek | Azathioprine | 0,19 |
| Salofalk | Mésalamine ; 5-ASA | 5,21 |
| Agopton | Lansoprazole | 0,18 |
| Asacol | Mésalamine ; 5-ASA | 2,50 |
| Vancocine | Vancomycine | 2,00 |
| Sulfaméthoxazole | Sulfaméthoxazole | 1,60 |
| Triméthoprim | Lactate de triméthoprim | 0,35 |
| Ciproxine | Ciprofloxacine | 1,25 |
| Vitamine E | Acétate de DL-α-tocophérol | 0,30 |
| Bion 3 | 3 probiotiques (107 UFC) : <i>Lactobacillus gasseri</i> PA16 / 8, <i>bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>bifidobacterium longum</i> SP07 / 3, 12 vitamines : 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), biotine (150 µg), acide folique (200 µg), niacine (18 mg), acide pantothénique (6 mg) et 7 minéraux : iode (100 µg), fer (5 mg), zinc (5 mg), sélénium (30 µg), chrome (25 µg), manganèse (1,2 mg), molybdène (25 µg) | 1,06 |
| Hémoglobine | Hémoglobine | 1,25 |

Tableau 25

Micro-organismes entéro-pathologiques

| Nom | Concentration finale (UFC/mL d'extrait de selles) |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 9,5 x 10 ⁷ |
| <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> | 1 x 10 ⁹ |
| <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> | 5,4 x 10 ⁷ |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 9,7 x 10 ⁷ |
| <i>Shigella flexneri</i> | 1,5 x 10 ⁸ |
| <i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> | 1,6 x 10 ⁸ |

Tableau 26

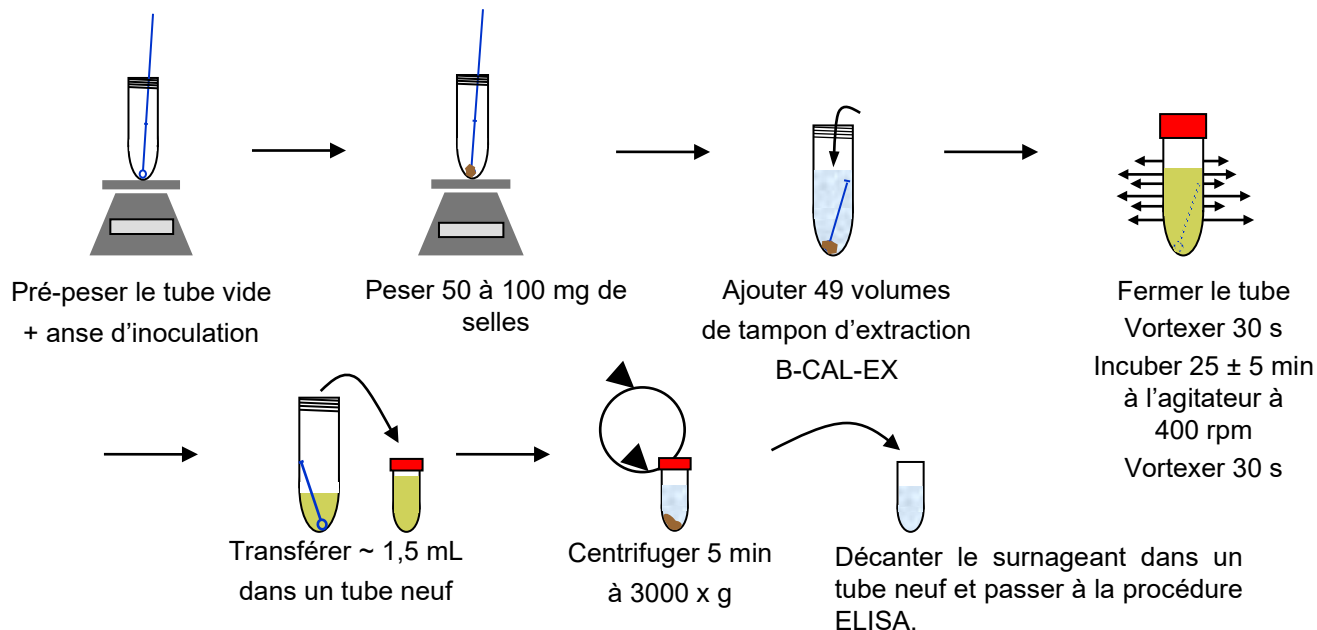
RÉFÉRENCES

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. Lasso 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)

MODE OPÉRATOIRE SIMPLIFIÉ

EXTRACTION DE CALPROTECTINE

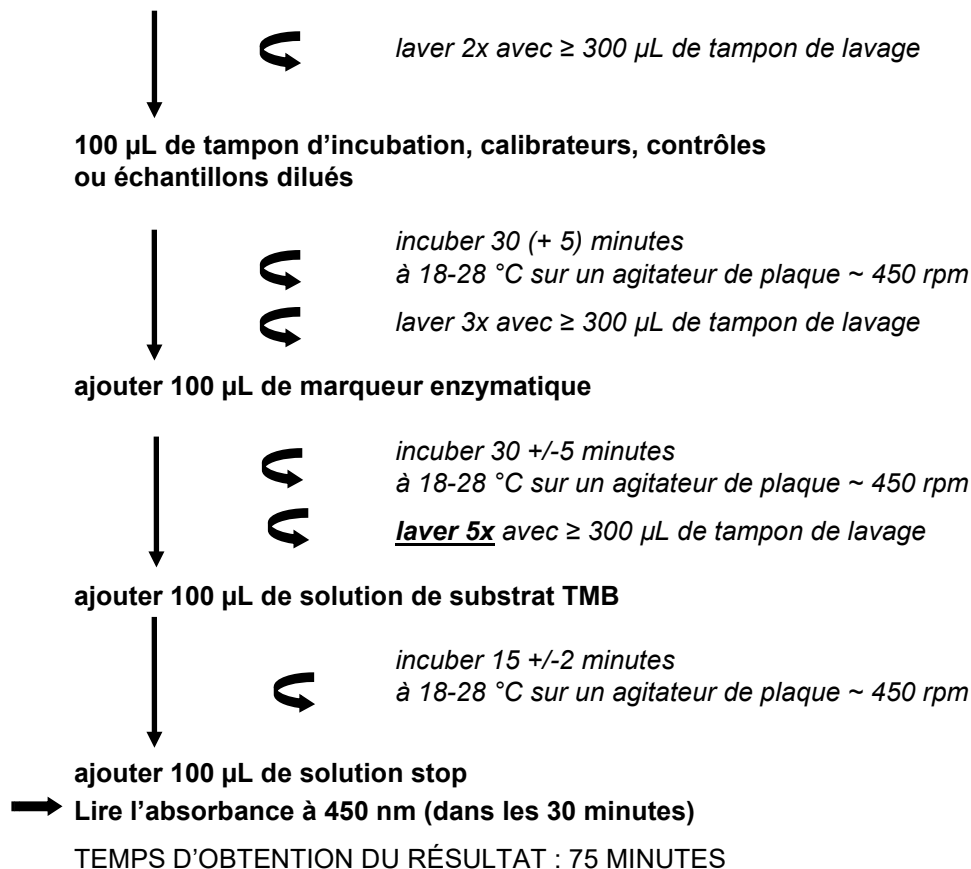
Procédure d'extraction manuelle



MODE OPÉRATOIRE SIMPLIFIÉ

CALPROTECTINE ELISA

Plaque de microtitration pré-coatée



JOURNAL DES MODIFICATIONS

| Date | Version | Modification |
|------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2022-11-16 | A3 | Mise à jour du chapitre <i>avertissements et précautions</i> Ajout des valeurs d'incertitude des calibrateurs et justification de la standardisation interne dans le chapitre <i>Standardisation</i> Mise à jour des formulations et simplification du chapitre <i>Caractéristiques de performances</i> Révision du chapitre <i>Symboles</i> Nouvelles informations sur le brevet Ajout du numéro de l'organisme notifié au marquage CE – procédure d'évaluation de la conformité selon IVDR 2017/746 |

RAPPORTS D'INCIDENTS DANS LES ÉTATS MEMBRES DE L'UE











En cas d'incident grave en lien avec ce dispositif, signalez-le sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État membre.

DOMMAGES PENDANT L'EXPEDITION

Veuillez notifier votre distributeur si vous avez reçu un produit endommagé.

SYMBOLES

BÜHLMANN utilise des symboles et des signes énumérés et décrits dans l'ISO 15223-1. En outre, les symboles et signes suivants sont utilisés:

| Symbole | Description |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
|  | Plaque de microtitration |
|  | Tampon d'extraction |
|  | Tampon de lavage concentré (10x) |
|  | Tampon d'incubation |
|  | Calibrateur A -E |
|  | Contrôle bas |
|  | Contrôle haut |
|  | Marqueur enzymatique |
|  | Substrat TMB |
|  | Solution stop |

Certaines composants du coffret sont protégées par les brevets EP2947459(B1) ; US10620216(B2) ; AU2015261919(B2) ; JP6467436(B2).

