

# CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)



## 1. UTILISATION

Le coffret **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** constitue une méthode d'identification quantitative pour la détermination de la Calprotectine dans les selles. Il s'agit d'un outil d'identification des maladies organiques de l'intestin grêle, du gros intestin et de l'estomac qui permet de déterminer l'activité de la maladie et suivre la réponse au traitement des patients souffrant de colites ulcératives ou de la maladie de Crohn.

Le coffret **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** a été validé pour une utilisation sur échantillons de selles.

**Réservé au diagnostic *in vitro*.**

## 2. VALEUR DIAGNOSTIQUE

Divers types de maladies organiques du tube digestif peuvent endommager la paroi intestinale (muqueuse intestinale). Ces dommages peuvent aller de l'augmentation de perméabilité à une inflammation ou une ulcération de la muqueuse. Les intestins sont riches en bactéries et autres microorganismes qui libèrent des substances qui peuvent être toxiques ou chimiotactiques. Ces substances peuvent induire une migration des leucocytes, en particulier des nucléaires neutrophiles granuleux polymorphes (PMN), vers la lumière intestinale où ils libèrent leur contenu dont des éléments antimicrobiens comme la Calprotectine. Cette protéine représente 60% des protéines totales du cytoplasme du PMN<sup>2)</sup> et peut être estimée de façon fiable dans les selles conservées jusqu'à sept jours à température ambiante<sup>3)</sup>.

La Calprotectine est une protéine de 36kDa fixant le calcium et le zinc<sup>4)</sup>, produite par les PMNs, les monocytes et par les cellules de l'épithélium pavimenteux (sauf celles de la peau normale)<sup>5,6)</sup>. En se liant au calcium, la Calprotectine résiste à la dégradation des enzymes leucocytaires et microbiennes<sup>3,7)</sup>. Grâce à sa capacité de liaison avec le zinc, elle peut inhiber par compétition de nombreuses enzymes zinc-dépendantes<sup>8)</sup> et ainsi détruire les micro-organismes et les cultures cellulaires, animales ou humaines<sup>9,10)</sup>. Certaines maladies, comme les infections bactériennes, la polyarthrite rhumatoïde ou le cancer, provoquent l'activation des PMNs et l'augmentation du niveau de Calprotectine dans le plasma, le fluide cérébrospinal, le liquide synovial, le fluide gingivale, l'urine et autres fluides biologiques humains<sup>1)</sup>.

Il est primordial que la concentration en Calprotectine dans les selles soit corrélée avec le nombre de PMNs migrant vers la lumière intestinale<sup>11)</sup>, et qu'elle puisse être détectée de façon fiable même dans les échantillons de selles réduits (inférieurs à 1 gramme)<sup>3,12)</sup>. De plus, la synthèse de la Calprotectine s'intensifie en cas de maladies organiques (5 à plusieurs milliers de fois supérieure au seuil de la population saine)<sup>3,13,14,15)</sup>, reflétant ainsi une inflammation intestinale.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comme les colites ulcéreuses ou la maladie de Crohn, peuvent apparaître au cours de l'enfance ou tardivement à l'âge adulte. Leur diagnostic est souvent retardé à cause de la difficulté à interpréter les symptômes ou à la réticence des patients à effectuer une endoscopie ou une biopsie. Le coffret **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** peut contribuer à un diagnostic précoce, puisqu'en cas de MICI active son résultat est généralement positif.

Les troubles fonctionnels intestinaux comme le syndrome du côlon irritable (SII) n'induisent pas l'augmentation de la concentration en Calprotectine, contrairement aux maladies organiques abdominales comme les MICIs. Les patients atteints de maladies organiques ou de troubles intestinaux peuvent présenter les mêmes symptômes et un examen clinique seul ne suffit pas au diagnostic final. Les examens complémentaires sont complexes, onéreux, peuvent être douloureux et exposer les patients à d'autres risques. Un test de détection de la Calprotectine fécale est simple, non invasif, peu coûteux et représente une méthode objective pouvant permettre de discriminer les patients nécessitant des examens complémentaires comme l'endoscopie. Les symptômes abdominaux sont communs chez

l'enfant et l'adulte et un résultat négatif indiqué par le coffret **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** peut écarter le diagnostic d'un trouble inflammatoire intestinal<sup>13</sup>.

La cicatrisation de la muqueuse intestinale est le but ultime pour le traitement des MICs, et un test de recherche de la Calprotectine peut indiquer une rémission clinique. Plusieurs patients considérés comme étant en rémission clinique avec un taux de protéine C-réactive (CRP) normal, présentent toujours une inflammation<sup>16</sup>, reflétée par l'augmentation de la Calprotectine dans les selles. Ces patients sont exposés à un risque accru de rechute au cours des mois suivants<sup>17</sup>. En cas de cicatrisation de la muqueuse intestinale, le risque de rechute et d'intervention chirurgicale diminue<sup>18,19</sup>. La stabilisation et le retour à la normale du taux de Calprotectine indique une cicatrisation de la muqueuse<sup>20</sup>.

Le risque et la gravité des effets secondaires liés au traitement doivent être comparés au risque d'une inflammation chronique, d'une grave rechute clinique et d'éventuelles complications.

La cicatrisation de la muqueuse intestinale fait l'objet de nombreux articles<sup>30-35</sup> et revues scientifiques<sup>21-29</sup>.

La technologie Calprotectine ELISA a également été utilisée pour l'analyse d'échantillons de sérum et de plasma. Des taux importants de Calprotectine ont été décelés chez des patients atteints d'infections bactériennes<sup>36-37</sup>, de septicémie ou de maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou le Lupus Erythémateux Systémique (LES)<sup>38-42</sup>. Les revues scientifiques montrent que la Calprotectine dans le sérum et le plasma est un marqueur important de l'activité de la maladie dans le cas d'une PR ou du LES, et que son taux permet de prédire les phases inflammatoires. Il s'agit également d'un marqueur dans les syndromes coronariens aigus conduisant à l'infarctus du myocarde<sup>43-45</sup>. La procédure de recueil des échantillons et les spécifications pour l'analyse du plasma (EDTA) sont disponibles aux chapitres 7.2 et 13.

D'autres échantillons organiques, sécrétions et excréments ont été analysés pour la détection de la Calprotectine, comme par exemple le fluide crévicaire (gingival) ou l'urine. Les concentrations en Calprotectine détectées et les protocoles varient en fonction des divers fluides et doivent être réalisés selon les méthodes publiées (e.g.<sup>1</sup>).

### 3. PRINCIPE DU TEST

Le coffret **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** repose sur la préparation d'un extrait de selles grâce au Tampon d'Extraction Fécale. Le dosage de la Calprotectine est effectué à partir de l'extrait par méthode immuno-enzymatique (ELISA).

Pour la procédure, les échantillons et les standards sont incubés dans différents puits sensibilisés par des anticorps monoclonaux qui se lient à la Calprotectine. Après incubation et lavage des puits, la Calprotectine fixée réagit avec une enzyme marquée, purifiée par immunoaffinité et spécifique aux anticorps anti-Calprotectine. La quantité d'enzyme liée est proportionnelle à la quantité de Calprotectine dans l'échantillon ou le standard. Elle est révélée par l'incubation du substrat enzymatique qui est transformé en produit coloré. L'intensité de la coloration est évaluée par l'absorbance lue sur un lecteur de plaques ELISA, et est proportionnelle à la concentration de Calprotectine dans l'échantillon ou les standards. Le dosage est étalonné à l'aide de Calprotectine purifiée à partir d'extraits leucocytaires.

### 4. COMPOSITION

#### 4.1. Réactifs fournis avec le coffret

- **MTP** **Microplaque sensibilisée**: 12 barrettes, 8 puits par barrette, sensibilisée aux anticorps monoclonaux de souris (purifié par affinité) spécifiques à la Calprotectine. La microplaque est conservée dans une pochette scellée avec un sachet déshydratant.
- **DIL 5x** **Tampon de Dilution d'échantillons (5x conc.)** \*\*\*: 1 x 20mL, concentré 5x, à diluer avec de l'eau distillée/déionisée; pH 8.0 ± 0.2, solution de couleur jaune, bouteille avec un bouchon bleu.
- **WASH|BUF 20x** **Solution de Lavage (20x conc.)** \*: 1 x 50mL, concentré 20x, à diluer avec de l'eau distillée/déionisée, à utiliser pour le lavage des puits; pH 7.8 ± 0.2, solution transparente, bouteille avec un bouchon blanc.
- **FEC|EXTR|BUF 2,5x** **Tampon d'Extraction Fécale (2.5x conc.)** \*\*: 2 x 90mL, concentré 2.5x, à diluer avec de l'eau distillée/déionisée; pH 8.0 ± 0.2, solution transparente, bouteilles avec bouchons blancs.

- **CAL A - F Standards Calprotectine \*\*\*:** 6 flacons de 1.0mL, prêt à l'emploi; solution de couleur jaune, flacons avec différentes couleurs de bouchons:
 

Standard A: Bouchon bleu	0	ng/mL
Standard B: Bouchon vert	7.8	ng/mL
Standard C: Bouchon jaune	31.3	ng/mL
Standard D: Bouchon rouge	62.5	ng/mL
Standard E: Bouchon blanc	125	ng/mL
Standard F: Bouchon noir	500	ng/mL
- **CTR LOW CTR HIGH Contrôles Calprotectine "Low" et "High" \*\*\*:** 2 flacons de 1.0mL, prêt à l'emploi; solution de couleur jaune; Ctr Low (concentration basse): flacon avec bouchon marron; Ctr High (concentration haute): flacon avec bouchon violet.
- **CONJ Conjugué \*\*\*\*:** 13mL anticorps (purifiés par immuno-affinité) polyclonaux de lapin anti-Calprotectine couplés à la phosphatase alcaline, prêt à l'emploi; solution de couleur rouge, Tube de réaction Dynex de 25mL avec bouchon blanc.
- **SUB pNPP Solution de substrat (pNPP):** 13mL, prêt à l'emploi; solution transparente à jaune pâle, bouteille opaque avec un bouchon jaune. La bouteille contient des billes de stabilisation. *Note:* En cas d'utilisation d'un instrument Dynex, le substrat doit être transvasé dans un tube Dynex de 25mL avant le lancement du test.
  - \* Contient 0.1 % de Kathon
  - \*\* Contient <0.1% d'azide de sodium
  - \*\*\* Contient 0.1 % de Kathon et <0.1% d'azide de sodium
  - \*\*\*\* Contient 0.02% de méthylisothiazolone et 0.02% de bromonitrodioxane

## 4.2. Matériel fournis

- 2 films adhésifs
- 1 Notice technique
- 1 Plan de plaque

## 4.3. Matériel requis non fourni

- Eau distillée/déionisée
- Matériel d'extraction (voir chapitres 7.1.1 et 7.1.2)
- Oeses d'ensemencement sécables et à usage unique (si utilisation de la méthode par pesée chapitre 7.1.3)
- Balance de précision digitale (40 – 150mg) (si utilisation de la méthode par pesée chapitre 7.1.3)
- Tubes en polystyrène à bouchons à vis à usage unique de 5mL (si utilisation de la méthode par pesée chapitre 7.1.3)
- Vortex
- Tubes à usage unique pour la dilution des échantillons: Tubes Eppendorf ou équivalent (si méthode manuelle)
- Pipettes de distribution des volumes de 10 – 1000µL (si méthode manuelle)
- Pipette répétitive ou pipette multicanal, 100µL (si méthode manuelle)
- Laveur de microplaques ou pipette multicanal, 300µL (si méthode manuelle)
- Agitateur de plaques (500 – 700rpm) (si méthode manuelle)
- Chronomètre (si méthode manuelle)
- Lecteur de microplaque, filtre 405nm (si méthode manuelle)
- 1M NaOH (solution stop; optionnel)

## 5. STABILITE ET CONSERVATION

Lorsque les coffrets non ouverts sont stockés entre +2°C et +8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret.

Les microplaques entamées, les réactifs et les tampons ouverts sont stables pendant 3 mois s'ils sont conservés entre +2°C et +8°C.

Lorsqu'elles sont reconstitués dans un flacon propre, les solutions de lavage, de dilution et d'extraction peuvent être stockées entre +2°C et +8°C jusqu'à un mois.

Eviter une exposition directe au soleil et à des températures élevées.

## 6. PREPARATION DES REACTIFS

Tous les réactifs, échantillons et contrôles doivent être ramenés à température ambiante (+18°C / +25°C) avant de commencer le dosage.

### 6.1. Microplaque sensibilisée

Les barrettes de la microplaque, prêtes à l'emploi, sont sensibilisées par des anticorps monoclonaux de souris (purifié par affinité) anti-Calprotectine. Replacer immédiatement les barrettes non-utilisées dans la pochette scellée accompagnée du sachet déshydratant fournis. Conserver à +2°C/+8°C.

### 6.2. Tampon de dilution d'échantillon

Diluer le tampon de dilution d'échantillon concentré 5x en ajoutant une dose (20mL) de tampon concentré à 4 doses (80mL) d'eau distillée/déionisée dans un flacon propre pour atteindre un volume final de 100mL. Mélanger. Conserver le tampon de dilution d'échantillon dilué dans un flacon bouché à +2°C /+8°C.

*Note:* En cas d'utilisation d'un instrument Dynex DS2 ou DSX, le tampon de dilution d'échantillon doit être transféré dans un tube Dynex de 25mL avant le lancement du test.

### 6.3. Solution de Lavage

Diluer le tampon de lavage concentré 20x en ajoutant une dose (50mL) de tampon concentré à 19 doses (950mL) d'eau distillée/déionisée dans un flacon propre pour un volume final de 1000mL. Mélanger. Conserver le tampon de lavage dilué dans un flacon bouché à +2°C /+8°C.

### 6.4. Tampon d'Extraction Fécale

Diluer le tampon d'extraction fécale concentré 2.5x en ajoutant une dose (90mL) de tampon concentré à 1.5 doses (135mL) d'eau distillée/déionisée dans un flacon propre pour un volume final de 225mL. Mélanger. Conserver le tampon d'extraction fécale dilué dans un flacon bouché à +2°C /+8°C.

### 6.5. Standards et contrôles

Les flacons étiquetés Standard A – F, ainsi que les contrôles contiennent chacun 1.0mL de solution prête à l'emploi. La concentration en Calprotectine est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon. Le flacon est adapté aux instruments Dynex DS2 et DSX.

### 6.6. Conjugué

Le tube contient 13mL d'anticorps (purifiés par immuno-affinité) polyclonaux de lapin anti-Calprotectine couplés à la phosphatase alcaline dans un tampon contenant des stabilisants, des conservateurs et un colorant inerte rouge. La solution est prête à l'emploi. Le tube est adapté aux instruments Dynex DS2 et DSX.

### 6.7. Solution de Substrat (pNPP)

Le flacon contient 13mL de solution *p*-nitrophenylphosphate (pNPP). La solution est prête à l'emploi et doit être conservée dans son flacon opaque d'origine.

*Note:* En cas d'utilisation d'un instrument Dynex DS2 ou DSX, la solution de substrat doit être transférée dans un tube Dynex de 25mL avant le lancement du test. Eviter de transvaser les billes de stabilisation.

## 7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le coffret CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP) a été développé et validé principalement pour des échantillons de selles, mais peut également être utilisé sur des échantillons de plasma ou sérum.

### 7.1. Echantillons de selles

La Calprotectine est très stable dans les selles, les patients peuvent par conséquent effectuer le prélèvement à domicile. Prélever 1 – 5g (approximativement une cuillère à thé) de selles, placer dans un flacon propre et l'apporter au laboratoire aussi rapidement que possible, au maximum dans les 4 jours. S'il est placé dans un flacon approprié à son transport, l'échantillon peut être envoyé par

courrier, aucune réfrigération n'est nécessaire. Eviter d'exposer l'échantillon à des températures supérieures à +30°C.

Les échantillons peuvent également être congelés, à -20°C ou plus bas, jusqu'à la livraison ou l'envoi. Les échantillons congelés doivent être dégelés et ramenés à température ambiante avant extraction et dosage. Il convient de noter que les échantillons de selles congelés peuvent, dans certains cas, présenter des taux de Calprotectine augmentés, le plus souvent en raison de sa libération par les granulocytes.

*Note:* Avant le prélèvement de l'échantillon et avant le début de l'extraction, l'échantillon de selles doit être homogénéisé, par exemple à l'aide d'une spatule.

Pour l'extraction, il est recommandé d'utiliser le coffret Calpro EasyExtract™ ou tout autre méthodes décrites ci-dessous (chapitres 7.1.2 et 7.1.3). Procéder à l'extraction selon les instructions d'utilisation de la méthode choisie. D'autres méthodes et dispositifs, s'ils sont validés en amont par l'utilisateur, peuvent être appliqués.

### **7.1.1. Extraction avec le coffret Calpro EasyExtract™**

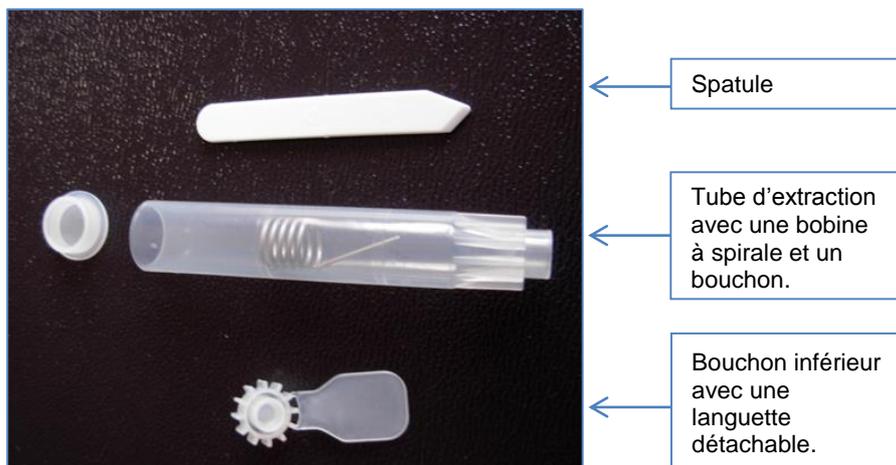
Instructions d'utilisation: prendre connaissance de la notice d'utilisation contenue dans le coffret No. CAL0510



(Calpro AS, Product No. CAL0510)

### **7.1.2. Extraction avec le dispositif d'extraction fécale**

Instructions d'utilisation: prendre connaissance de la notice d'utilisation contenue dans le coffret No. CAL0500



(Calpro AS, Product No. CAL0500)

### **7.1.3. Extraction utilisant une méthode par pesées (sans dispositifs d'extraction)**

1. Tarer un tube, et une oese d'ensemencement.
2. Prélever approximativement 100mg (entre 40 et 120mg) de selles au moyen de l'oese d'ensemencement. Placer l'oese dans le tube. Eviter de prélever des éléments solides, non digérés comme des fibres ou des graines.

3. Peser le tube et l'oesse contenant les selles, afin de déterminer le poids net de selles.
4. Casser l'oesse au niveau de la moitié du manche et laisser le reste dans le tube.
5. Ajouter le tampon d'extraction pour une dilution au 1/50<sup>ème</sup> soit 4.9mL de tampon pour 100mg de selles. Fermer le tube.
6. Vortexer vigoureusement pendant 30 secondes.
7. Continuer à mélanger sur un agitateur (à environ 1000rpm) pendant 30±5 minutes avec l'oesse à l'intérieur du tube.
8. Laisser décanter deux minutes sur la paillasse et pipeter le surnageant avec précaution. La centrifugation n'est pas nécessaire, mais une centrifugation rapide peut être effectuée si une solution sans particules est souhaitée.
9. L'extrait qui représente une dilution au 1/50<sup>ème</sup> (poids/volume) de l'échantillon de selles est désormais prêt pour dilution et dosage.
10. Pour conservation, transférer 0.5mL dans un nouveau tube. Les extraits peuvent être conservés à +2°C/+8°C pendant cinq jours ou congelés en dessous de -20°C jusqu'à 2 ans <sup>48</sup>).

## 7.2. Echantillons de Plasma et sérum

Pour déterminer les taux réels de Calprotectine dans un échantillon de sérum ou de plasma, il faut éviter le relargage, *in vitro*, par les neutrophiles granulocytes des protéines (au moment du prélèvement). Pour un dosage sur plasma, il est recommandé d'utiliser l'EDTA comme anticoagulant.

Procédure de prélèvement préconisé :

1. Prélever le sang à l'aide d'un système vacutainer.
2. Dès que possible, centrifuger le sang à 3000rpm pendant 10 minutes, au maximum 3 heures après le prélèvement.
3. Pipeter uniquement les deux tiers supérieurs du tube de sérum ou plasma afin d'éviter l'aspiration des leucocytes de la couche leuco-plaquettaire.

Pour un dosage ELISA, diluer le sérum ou plasma au 1/20<sup>ème</sup> (ex: 50µL d'échantillon + 950µL de Tampon de dilution d'échantillon) et suivre la procédure décrite au chapitre 9.

## 8. SUGGESTION DE PLAN DE PLAQUE

	1	2	3	4	etc.	
<b>A</b>	Standard F 500 ng/mL	Standard F 500 ng/mL	Echantillon 1	Echantillon 1		
<b>B</b>	Standard E 125 ng/mL	Standard E 125 ng/mL	Echantillon 2	Echantillon 2		
<b>C</b>	Standard D 62.5 ng/mL	Standard D 62.5 ng/mL	Echantillon 3	Echantillon 3		
<b>D</b>	Standard C 31.3 ng/mL	Standard C 31.3 ng/mL	Echantillon 4	Echantillon 4		
<b>E</b>	Standard B 7.8 ng/mL	Standard B 7.8 ng/mL	Echantillon 5	Echantillon 5		
<b>F</b>	Standard A 0 ng/mL	Standard A 0 ng/mL	Echantillon 6	Echantillon 6		
<b>G</b>	Control "Low"	Control "Low"	Echantillon 7	Echantillon 7		
<b>H</b>	Control "High"	Control "High"	Echantillon 8	Echantillon 8		

Suggestion de plan de plaque ELISA pour l'emplacement des standards, contrôles et échantillons pour une méthode manuelle. Le dépôt en double est recommandé afin d'augmenter la fiabilité des résultats. Une plaque entière permet l'analyse de 40 échantillons.

## 9. MODE OPERATOIRE

La procédure suivante s'applique à un dosage par méthode manuelle. Les protocoles sur automates Dynex DS2 et DSX sont disponibles sur demande. Veuillez noter que les flacons de standards, contrôles et conjugué sont adaptés aux instruments DS2 et DSX. D'autres instruments, s'ils sont validés en amont par l'utilisateur, peuvent être employés.

### Remarques concernant la procédure

- Préparation: Lire attentivement la notice d'utilisation avant le dosage. La fiabilité des résultats dépend du respect le plus strict du protocole. Avant de commencer le dosage, il convient d'établir un plan de plaque pour déterminer l'emplacement des standards, contrôles et échantillons. Utiliser par exemple, la feuille de travail fournie avec le coffret. Sélectionner le nombre exact de barrettes nécessaire. Replacer les barrettes non utilisées à l'intérieur du sachet en aluminium scellé et conserver comme indiqué au chapitre 6.1.
- Il est recommandé d'effectuer une dilution au 1/100<sup>ème</sup> des extraits de selles. Les résultats obtenus pour cette dilution seront compris entre 25 mg/kg (Limite de quantification) et 2500 mg/kg. Les extraits de selles contenant des taux en Calprotectine supérieurs pourront être dilués au-delà du 1/100<sup>ème</sup> et re-dosés si une quantification est nécessaire. Inversement, les extraits de selles contenant un taux faible en Calprotectine pourront être moins dilués (1/50<sup>ème</sup>). Le facteur de dilution doit être pris en compte lors de la conversion des ng/mL en mg/kg (voir chapitre 11 ci-après).
- Réaliser chaque étape du protocole dans l'ordre défini et en évitant tout délai important entre les étapes.
- Utiliser un cône de pipette neuf pour chaque standard, contrôle et échantillon.
- Le dépôt en double des standards, contrôles et échantillons patients est recommandé afin d'augmenter la fiabilité des résultats.
- Ramener tous les échantillons et réactifs du coffret à température ambiante avant de commencer le dosage.

### Procédure ELISA

1. Diluer les extraits de selles au 1/100<sup>ème</sup> (ex 10 $\mu$ L d'échantillon dans 990 $\mu$ L de Tampon de dilution d'échantillon) et vortexer.
2. Déposer en double 100 $\mu$ L de chaque standard, contrôle et échantillon dans les puits. Voir plan de plaque recommandé chapitre 8.
3. Couvrir la plaque avec un film adhésif et incuber à température ambiante pendant 40 $\pm$ 5 min\*) sur un agitateur de plaque en position horizontale (agitation approximative à 500-700 rpm).
4. A la fin de la période d'incubation, vider les puits et procéder à une série de 3 lavages en solution de lavage, 300 $\mu$ L par puits. Eliminer autant de liquide que possible entre chaque lavage. En cas d'utilisation d'un laveur de plaque, s'assurer que les sondes d'aspiration et de répartition ne soient pas bouchées pour assurer un lavage efficace des puits. A l'issue du dernier lavage, éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.
5. Mélanger délicatement le flacon de conjugué avant son utilisation (ne pas vortexer). Déposer 100 $\mu$ L de conjugué dans chaque puits. Utiliser de préférence une pipette répétitive ou multicanal.
6. Couvrir la plaque avec un film adhésif et incuber à température ambiante pendant 40 $\pm$ 5 min\*) sur un agitateur de plaque en position horizontale (agitation approximative à 500-700 rpm).
7. Répéter l'étape de lavage décrite ci-dessus, trois lavages avec 300 $\mu$ L de solution de lavage par puits.
8. Déposer 100 $\mu$ L de substrat dans chaque puits. Utiliser de préférence une pipette répétitive ou multicanal.
9. Incuber la plaque à température ambiante (sans agitation) pendant 20 – 30 minutes à l'abri de la lumière.
10. *Facultatif*: déposer 100 $\mu$ L de solution d'arrêt NaOH 1M dans chaque puits si une période d'incubation précise est préconisée.
11. Lire la densité optique (DO) à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Si le lecteur de plaques possède cette option : agiter la plaque brièvement (2-3 secondes) avant la lecture.

\*) **Facultatif: Temps d'incubation réduit (procédure sans agitateur).** Le temps d'incubation peut être réduit à  $30 \pm 5$  min sans incidence sur les résultats. Une diminution de la DO est possible et la DO du standard le plus élevé (500 ng/mL) peut ne pas atteindre la DO recommandée de 1.800. Cela n'affecte pas les résultats<sup>46</sup>.

## 10. CONTROLE QUALITE

- Une nouvelle gamme étalon doit systématiquement être incluse dans chaque série.
- Les contrôles positifs doivent systématiquement être inclus dans chaque série. Les valeurs obtenues pour les contrôles doivent être comprises dans les intervalles d'acceptation précisées sur les étiquettes des flacons.
- La DO du Standard F (500 ng/mL) doit être  $\geq 1.6$  et la DO du Standard A (0 ng/mL) doit être  $\leq 0.25$ . Un exemple de courbe standard est représenté (figure 1).

## 11. EVALUATION

Calcul de la concentration en Calprotectine dans les échantillons fécaux des patients :

1. Calculer la moyenne des DO de tous les puits dupliqués (standards et échantillons).
2. Tracer la courbe d'étalonnage en portant en abscisse (axe des X) la concentration (ng/mL) des standards et en ordonnée (axe des Y) la moyenne des DO correspondantes. Une courbe de type polynomiale de degré 4, ou de type 4PL est recommandée (voir figure 1 ci-après). Utiliser la valeur de 0.001 ng/mL pour le standard A (0 ng/mL) dans le cas où un axe logarithmique x est préconisé.
3. A partir des DO obtenues, utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration (ng/mL) en Calprotectine des échantillons dilués.
4. **Multiplier la concentration (ng/mL) en Calprotectine des extraits de selles dilués par 5 pour convertir le résultat en mg/kg dans l'échantillon original.**

Ce facteur de multiplication correspond à la dilution finale  $1/5000^{\text{ème}}$  ( $1/50^{\text{ème}}$  au cours de l'étape d'extraction suivie d'une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  de l'extrait) et à la conversion de ng/mL à mg/kg.

*Exemple: Si une concentration de 100 ng/mL est obtenue pour un extrait dilué, la concentration en Calprotectine dans l'échantillon de selle original est de  $100 \times 5 = 500$  mg/kg.*

A noter: Si l'extrait a été dilué différemment qu'à la dilution recommandée ( $1/100^{\text{ème}}$ ), tenir compte du facteur de dilution dans le calcul.

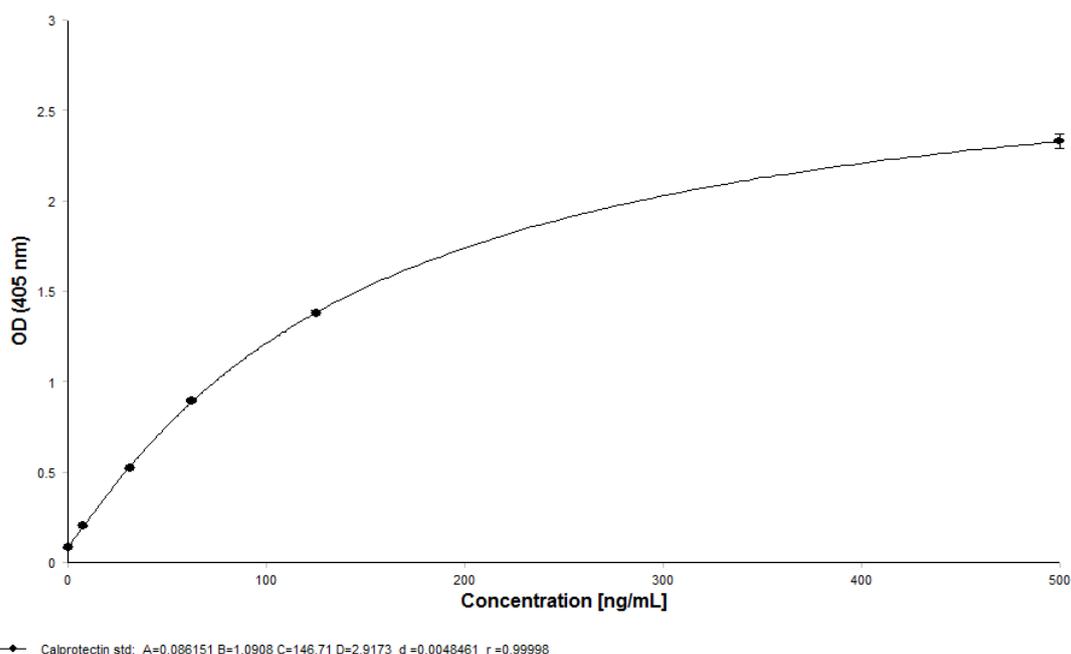


Figure 1: Courbe d'étalonnage de type polynomiale de degré 4.

## 12. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les valeurs de concentration en Calprotectine généralement retrouvées dans la littérature, sont <sup>3, 47)</sup>:

Valeur normale	5 – 50 mg/kg
Valeur positive	> 50 mg/kg
Valeur moyenne obtenue pour des patients atteints de cancer colorectal symptomatique.	350 mg/kg
Valeur moyenne obtenue pour des patients atteints de maladies intestinales inflammatoires actives et symptomatiques.	200 – 40,000 mg/kg.

Il convient de noter que le diagnostic final ne peut être établi à partir du seul résultat du dosage. Le diagnostic devra prendre en considération l'ensemble des symptômes du patient ainsi que ses antécédents cliniques.

Les résultats de concentration en Calprotectine suivant ont été dosés à partir de sang de 100 donneurs sains (50 femmes et 50 hommes) :

Type d'échantillon:	Moyenne (µg/L):	Ecart-Type
EDTA plasma	627	307

## 13. SPECIFICATIONS

A noter: Toutes les études de performance ont été effectuées en suivant la procédure décrite au chapitre 9, par méthode manuelle à partir d'extrait de selles (dilués au 1/100<sup>ème</sup>) ou de plasma recueillis sur EDTA (dilués au 1/20<sup>ème</sup>).

### Précision inter-essai, extraits de selles

Moyenne des résultats de trois laboratoires, utilisant des coffrets de deux lots différents : six échantillons ont été testés 10 fois sur 5 jours:

Concentration dans les selles (mg/kg)	CV%
32.1	13
171	6.0
368	4.8
583	6.1
1215	6.8
1977	7.9

### Précision intra-essai, extraits de selles

Moyenne des résultats de trois laboratoires, utilisant des coffrets de deux lots différents : six échantillons ont été testés 10 fois dans une série:

Concentration dans les selles (mg/kg)	CV%
28.7	6.7
173	3.6
385	4.1
592	4.0
1210	4.2
1966	5.0

### Précision intra-essai, plasma recueillis sur EDTA

Moyenne des résultats obtenus sur un lot : six échantillons dilués au 1/20<sup>ème</sup> et testés 10 fois dans une série :

Concentration plasmique (ug/L)	CV%
166	3.8
740	4.7
1160	2.9
1360	3.5
2980	3.2
3660	10

### Test de recouvrement

Selles: 85 – 105%; effectué sur extrait de selles enrichis avec de la Calprotectine purifiée à 5 concentrations différentes.

Plasma: 81 – 105%; effectué sur plasma enrichis avec de la Calprotectine purifiée à 5 concentrations différentes.

#### **Limite de quantification:**

5ng/mL; déterminée à partir d'extrait de selles, plasma et Calprotectine purifiée. Les échantillons ont été analysés 5 fois sur 5 jours différents. Le CV moyen pour les différents échantillons, à cette concentration était de 12%.

#### **Limite de Détection:**

< 5 ng/mL; moyenne calculée pour le tampon de dilution échantillon (n=32) +5x Ecart-types

#### **Comparaison avec le coffret Calpro Calprotectin ELISA CAL0100**

Les échantillons analysés sur coffrets CAL0100 et CALP0170 présentent une corrélation et une concordance satisfaisantes:

Extraits de selles:  $R^2 = 0.792$  (48 – 1250 mg/kg, n=118 échantillons)

$R^2 = 0.864$  (48 – 500 mg/kg, n=85 échantillons)

Plasma:  $R^2 = 0.977$  (260 – 6400  $\mu\text{g/L}$ , n=16 échantillons)

#### **Interférence**

Aucune interférence n'a été constatée concernant les produits pharmaceutiques couramment utilisés : Prednisolone, Imurel, Salazopyrine et Ciprofloxacine.

#### **Précision de la procédure d'extraction.**

Deux échantillons de selles ont été extraits 10 fois chacun, selon la procédure décrite au chapitre 7.1.2. Les extraits ont ensuite été analysés par technique ELISA. Ci-après la moyenne des résultats obtenus dans trois laboratoires, sur un lot de coffret :

<b>Echantillon</b>	<b>Concentration (mg/kg)</b>	<b>CV%</b>
Niveau Bas	130	8.7
Niveau Haut	1357	8.8

#### **Linéarité du test (échantillon : extrait de selles)**

Des extraits de selles (n=10) ont été dilués du 1/100<sup>ème</sup> au 1/1000<sup>ème</sup> et analysés par technique ELISA. Ci-après la moyenne des résultats obtenus :

<b>Dilution</b>	<b>Linéarité par rapport à la dilution originale de 1/100</b>
1/100 <sup>ème</sup>	100
1/400 <sup>ème</sup>	103
1/700 <sup>ème</sup>	105
1/1000 <sup>ème</sup>	107

A noter: une variation linéaire est présente.

#### **Linéarité du test (échantillon : plasma recueilli sur EDTA)**

Les échantillons de plasma (n=5) ont été dilués du 1/20<sup>ème</sup> au 1/80<sup>ème</sup> et analysés par technique ELISA. Ci-après la moyenne des résultats obtenus :

<b>Dilution</b>	<b>Linéarité par rapport à la dilution originale de 1/20</b>
1/20 <sup>ème</sup>	100
1/40 <sup>ème</sup>	107
1/80 <sup>ème</sup>	116

A noter: une variation linéaire est présente.

## 14. LIMITES DE LA PROCEDURE

- Le diagnostic final ne peut être établi uniquement à partir du seul résultat du dosage. Le diagnostic devra prendre en considération l'ensemble des symptômes du patient ainsi que ses antécédents cliniques.

## 15. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- Conformément à l'article 1 paragraphe 2b de la Directive Européenne 98/79CE, l'utilisation des dispositifs de diagnostic *in vitro* est destinée par le fabricant à assurer l'adéquation, les performances et la sécurité du produit. Pour cette raison, la procédure, les informations, les précautions et avertissements doivent être suivis. L'utilisation des coffrets sur automate doit être validée. Toute modification de la conception, de la composition ou de la procédure de dosage, tout comme l'utilisation des kits avec des produits non approuvés n'est pas autorisé ; seul l'utilisateur est responsable de ces éventuelles modifications. Le fabricant décline toutes responsabilités concernant les faux résultats ou les incidents obtenus dans ces circonstances. Le fabricant décline toutes responsabilités concernant l'examen visuel des échantillons de patients.
- Réservé au diagnostic *in vitro*.
- Tous les composants d'origine humaine contenus dans les réactifs ont fait l'objet de recherches d'anticorps anti-HIV, anti HCV et d'antigènes de l'hépatite B. Celles-ci se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.
- Ne pas interchanger les réactifs ou les barrettes de différents lots.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants.
- Ne pas utiliser les réactifs dont la date de péremption indiquée sur l'étiquette est dépassée, ou après un mois, pour les solutions de travaux diluées.
- Utiliser uniquement des cônes de pipettes propres, des distributeurs et équipements réservés aux laboratoires.
- Afin d'éviter les contaminations croisées, ne pas interchanger les bouchons des réactifs.
- Refermer les flacons soigneusement et immédiatement après utilisation afin d'éviter leur évaporation et leur contamination.
- Après réouverture des flacons, vérifier que le conjugué, les standards et les contrôles ne soient pas contaminés avant de les utiliser.
- Afin d'éviter les contaminations croisées et une mauvaise interprétation des résultats, déposer les standards, contrôles et extraits de selles, puis conjugué et substrat, dans le fond des puits de la microplaque en évitant les éclaboussures.
- Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium et/ou du Kathon à une concentration  $\leq 0.1\%$  (w/v).
- Conserver le substrat dans son emballage d'origine opaque; la solution doit être transparent à jaune pâle. Mélanger délicatement avant utilisation.
- Le coffret **CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP)** est réservé au personnel qualifié et formé aux bonnes pratiques de laboratoire.

## Informations relatives à l'élimination

Les résidus de produits chimiques et les préparations sont généralement considérés comme déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est soumise à la réglementation nationale et régionale. Contacter les autorités compétentes ou les entreprises de gestion des déchets qui vous indiqueront les consignes à appliquer pour l'élimination des déchets dangereux.

## 16. REFERENCES

1. Johne B et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. J Clin Pathol: Mol Pathol 1997; 50:113-123.
2. Fagerhol MK et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith VL and Dedman JR (eds): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p. 187-210
3. Røseth AG et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in faeces. Scand J Gastroenterol 1992; 27: 793-798.

4. Dale I et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem* 1983;134: 1-6.
5. Dale I et al.: Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. *American J of Clin Pathology* 1985; 84: 24-34
6. Brandtzaeg P et al.: Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *American J of Clin Pathology* 1987; 87: 700-707.
7. Fagerhol MK: Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49: M74-M79.
8. Isaksen B and Fagerhol MK: Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 289-292.
9. Steinbakk M et al.: Antimicrobial actions of calcium binding leukocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336: 763-765.
10. Yui S et al.: Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukaemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudates cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 58: 650-658.
11. Røseth AG et al.: Correlation between faecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 50-54
12. Tøn H et al.: Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292: 41-54.
13. Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506-513.
14. Bunn SK et al.: Fecal calprotectin: Validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33: 14-22.
15. Bjarnason I and Sherwood R: Fecal calprotectin: A significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Paediatric Gastroenterology Nut* 2001; 33: 11-13
16. Siegmund B et al.: [What has been confirmed in the treatment of inflammatory bowel disease?]. *Internist* 2010;51:1492-1498
17. Tibble JA et al.: Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] *Gastroenterology* 2000; 119(1):15-22.
18. Schnitzler F et al.: Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1295-1301
19. Björkstén CG et al.: Endoscopic monitoring of infliximab therapy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, Sep 21
20. Røseth AG et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58:176-80
21. Devlin SM and Panaccione R: Evolving inflammatory bowel disease treatment paradigms: top-down versus step-up. *Med Clin North Am*. 2010;94:1-18
22. Pineton de Chambrun G et al.: Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(1):15-29
23. Lichtenstein GR and Rutgeerts P: Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:338-346
24. Smith MA et al.: Pharmacogenomics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics*, 2010;11(3):421-437
25. Lin MV et al.: What is the optimal therapy for Crohn's disease: step-up or top-down? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(2):167-180
26. Strauch U and Schölmerich J.: Emerging drugs to treat Crohn's disease. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010;15(2):309-322
27. Isaacs KL: How rapidly should remission be achieved? *Dig Dis* 2010;28(3):548-555
28. Schwartz M and Regueiro M: Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011 Feb;13(1):95-100
29. Ha C and Kornbluth A: Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12(6):471-478.
30. Fagerberg UL et al.: Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45(4):414-420
31. Rutgeerts P et al.: Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2009;136(5):1182-1197
32. Jalocha L et al.: Mucosal healing in Crohn disease. *Pol Merkur Lekarski*. 2009;26(155):554-555;
33. Baert F et al.: Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2010;138(2):463-468

34. Allez M and Lémann M: Role of endoscopy in predicting the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16:2626-2632
35. Lassen A: Calprotectin in feces a well-documented marker of gastrointestinal inflammation. Indicates disease intensity--normalization of values predict mucosal healing. *Läkartidningen*, 2010;107(143):2645-2649
36. Sander J et al.: Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest.* 1984 Jun;44(4): 357-62
37. Golden BE et al.: Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1996 Feb;74(2):136-9
38. Berntzen HB et al.: The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1991; 20(2): 74-82
39. Haga HJ et al.: Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 1993; 2(1): 47-50
40. Madland TM et al.: Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol.* 2002;31(6):351-354
41. Frosch M et al.: Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2622-2626
42. Hammer HB et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1093-97
43. Arvesen K et al.: *Eur Heart J.* 1996 Aug;17 Abstr Suppl:1-646.
44. Katashima et al.: Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ Journal* 2010;74(4):741-8
45. Altwegg LA et al.: Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2007;28(8):941-8
46. Calpro AS Information letter, June 2012 (available upon request: mail@calpro.no)
47. Johne B et al.: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia, *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 291-296
48. Internal Design Verification Report: Stability of Calprotectin in frozen stool samples and extracts, VR.02.027, 2014-04-09

## 17. INFORMATION DE COMMANDE

Référence produit: CALP0170

CALPROLAB™ Calprotectin ELISA (ALP) (96 Déterminations)

Index des symboles/Symbols Key / Symbolschlüssel / Tabela de símbolos	
	Fabriqué par/ Manufactured by / Hergestellt von / Fabricado por / Fabricado por
<b>IVD</b>	Dispositif de Diagnostic <i>In Vitro</i> / In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Producto para diagnóstico in vitro
<b>LOT</b>	Numéro de lot /Lot Number / Chargenbezeichnung / Número de lote
	Date d'expiration/ Expiration Date / Verfallsdatum / Data de Validade
	Limites de température/ Storage Temperature / Lagertemperatur / Temperatura de almacenamiento
<b>CE</b>	Déclaration de conformité CE/CE Mark / CE-Zeichen / Marca CE
<b>REF</b>	Référence catalogue/ Catalogue Number / Katalog Nummer / Número de Catálogo
	Consulter les instructions d'utilisation/ Catalogue Number / Katalog Nummer / Número de Catálogo
<b>MTP</b>	Microplaque/ Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaca
<b>CONJ</b>	Conjugué/ Conjugate / Konjugat / Conjugado
<b>CAL</b>	Calibrateur A-F/ Calibrator A-F / Kalibrator A-F / Calibrador A-F
<b>CTR LOW</b>	Contrôle bas/ Control Low / Kontrolle Niedrig / Control Bajo
<b>CTR HIGH</b>	Contrôle Haut/ Control High / Kontrolle Hoch / Control Alto
<b>DIL 5x</b>	Diluant d'échantillons concentré 5x/ Sample diluent buffer 5x concentrated / Probenverdünnungspuffer 5x konzentriert / Solución tampón para muestras concentrado x5
<b>SUB pNPP</b>	Substrat pNPP/ pNPP Substrate solution / pNPP-Substratlösung / Solución substrato pNPP
<b>FEC EXTR BUF 2,5x</b>	Tampon d'extraction fécale concetre 2.5x/ Faecal Extraction Buffer 2,5x concentrated / Stuhlextraktionspuffer 2,5x konzentriert / Buffer fecal de extracción (2,5 x conc.)
	Nombre de tests/ Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenido suficiente para "n" tests

**Fabriqué par:**  
**CALPRO AS**  
 Arnstein Arnebergs vei 30  
 N-1366 Lysaker, Norway  
 Tel: +47 67 43 01 34  
 mail@calpro.no  
 www.calpro.no

**Produit dans l'UE pour**  
**CALPRO AS**

**Distribué par THERADIAG**  
  
 14 Rue Ambroise Croizat –  
 CS 90136 Croissy-Beaubourg  
 77423 Marne la Vallée Cx 2  
 Tel.: 01 64 62 10 12  
 Fax: 01 64 62 09 66  
 Email: [info@theradiag.com](mailto:info@theradiag.com)  
 Website: [www.theradiag.com](http://www.theradiag.com)

## GUIDE RAPIDE

### CalproLab™ ELISA (ALP) pour le dosage de la Calprotectine dans les selles.

Se référer au chapitre 7 – 9 de la notice d'utilisation pour une description complète des étapes de la procédure et pour l'analyse sur plasma/sérum.

#### Extraction

- Procéder à l'extraction selon l'une des méthodes décrites au chapitre 7.1.1 – 3.

#### ELISA (procédure manuelle)

- Diluer l'extrait de selles au 1/100<sup>ème</sup> dans le Tampon de Dilution d'échantillon.
- Déposer 100 µL de standards, de contrôles et d'échantillons dans la microplaque ELISA.
- Incuber sur un agitateur de plaque à température ambiante pendant 40±5 min\*).
- Laver les puits trois fois avec 300 µL de Solution de Lavage.
- Déposer 100µl de conjugué dans chaque puits.
- Incuber sur un agitateur de plaque à température ambiante pendant 40±5 min\*).
- Laver les puits trois fois avec 300 µL de Solution de Lavage.
- Déposer 100 µL de Substrat pNPP dans la chaque puits.
- Incuber à l'abri de la lumière pendant 20 – 30 min
- Facultatif*: Déposer 100 µL de solution d'arrêt NaOH 1M dans chaque puits.
- Lire la DO à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.
- Calculer le résultat (ng/mL) en traçant une courbe 4PL.
- mg/kg dans les selles = ng/mL × 5

\*) peut être réduit à 30±5 min si le dosage est effectué sans agitation

Pour toutes questions, contacter [support@theradiag.com](mailto:support@theradiag.com)