

NOTE D'INFORMATION

Objet : téléchargement notice sur le site <http://www.cisbio.com/ivd-pi>

Cher client,

Nous vous informons que la révision de notice indiquée dans le certificat d'analyse du kit utilisé ne peut pas être mise à disposition en raison du passage au nom Revvity. Ainsi vous devez utiliser la version de notice 004 de la P3NP (N-Terminal Procollagène III Peptide) ELISA (ref 30176061) ci-après, qui correspondent à la version de notice indiquée sur le certificat d'analyse de votre kit mais avec un branding Revvity.

Pour toute information complémentaire, nous vous remercions de contacter cisbio.iva@revvity.com

Le Service Affaires Réglementaires de Cisbio Bioassays.

INFORMATION

Subject: Download notice from <http://www.cisbio.com/ivd-pi>

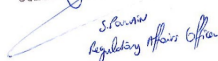
Dear customer

We would like to inform you that the revision of the package insert indicated in the certificate of analysis for the kit used cannot be made available due to the changeover to Revvity name. You must therefore use version 004 of the P3NP (N-Terminal Procollagen III Peptide) ELISA (ref 30176061) hereafter, which correspond to the leaflet version indicated on the certificate of analysis for your kit but with the Revvity branding.

For any further information, please contact cisbio.iva@revvity.com

Cisbio Bioassays Regulatory Affairs Service

Cisbio Bioassays
Par Marcel Boiteux
30200 Codolet - France



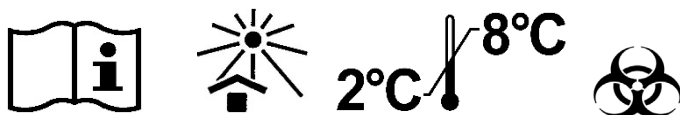
Regulatory Affairs Officer

P3NP (N-Terminal Procollagène III Peptide) ELISA

P3NP-ELISA est un immuno-essai destiné à la mesure quantitative de la concentration du peptide N-terminal du procollagène de type III (PIIINP) dans le sérum, le plasma EDTA ou hépariné.

REF **30176061**

 **12x8**



EU: **IVD**  



Cisbio Bioassays
Parc Marcel Boiteux – BP 84175
30200 Codolet, France



IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Hamburg, Germany

Tel.: +49 (0) 40 53 28 91-0
Fax: +49 (0) 40 53 28 91-11
IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Always there for you

1. NOM ET INDICATION

P3NP (N-Terminal Procollagène III Peptide) ELISA est un immuno-essai destiné à la mesure quantitative de la concentration du peptide N-terminal du procollagène de type III (PIIINP) dans le sérum, le plasma EDTA ou hépariné.

La trousse est destinée à un usage professionnel pour du diagnostic in vitro.

2. INTRODUCTION

Le procollagène de type III est synthétisé dans les fibroblastes en tant que précurseur du collagène de type III, puis il est excrété. Les propeptides sont dissociés dans l'espace extracellulaire lors de la transformation en collagène. Au cours de ce processus, le propeptide N-terminal (PIIINP, PM 45000) est formé en quantité équimolaire par rapport au collagène de type III, puis il est déversé dans la circulation sanguine.

Les taux circulants de ce propeptide peuvent donc servir de mesure de la synthèse du collagène de type III.

2.1. Signification clinique de la détermination quantitative du peptide N-terminal du procollagène de type III

Les principaux collagènes présents dans le tissu conjonctif du foie sont de type I et de type III. Dans des conditions pathologiques où on constate une prolifération active du tissu conjonctif (fibrose) dans le foie, la concentration en peptide N-terminal du procollagène de type III augmente.

La transformation du tissu hépatique fonctionnel en tissu conjonctif peut être détectée suite à l'augmentation du taux de peptide N-terminal du procollagène de type III dans la circulation sanguine. Notamment dans les cas suivants :

- **fibrose et cirrhose hépatiques liées à l'alcool ou induites par un virus**
- **stéatohépatite non alcoolique (NASH)** [1].

De plus, les lignes directrices européennes S3 relatives au traitement systémique du *psoriasis vulgaris* préconisent d'inclure le dosage du PIIINP dans les contrôles en laboratoire afin de surveiller le risque de fibrose du foie chez les patients traités par méthotrexate [2].

2.2. Valeurs pathologiques

Les conditions pathologiques affectant le foie, associées à une prolifération active des tissus conjonctifs, favorisent l'augmentation des taux sériques de PIIINP. Par conséquent, la transformation des tissus hépatiques fonctionnels en tissus conjonctifs peut être détectée en mesurant le taux de PIIINP dans le sérum. En fonction du degré de gravité de la maladie, le taux sérique de PIIINP augmente dans les cas d'hépatite active chronique, de fibrose et de cirrhose du foie.

Dans les cas d'hépatite chronique persistante, les taux sont généralement normaux; le taux de peptide du procollagène de type III peut augmenter en cas de dégénérescence du foie.

Dans les cas d'hépatite aiguë, le taux sérique du peptide du procollagène de type III augmente également.

Il existe cependant d'autres conditions dans lesquelles le taux de PIIINP augmente sans changement détectable de la fonction hépatique (ex. la fibrose pulmonaire [3], les affections rhumatismales, l'infarctus du myocarde [4], l'acromégalie, traumatismes multiples).

L'importance diagnostique réside dans le suivi de l'évolution de la maladie. Il existe une bonne corrélation avec les résultats histologiques de la fibrose et de la cirrhose.

3. PRINCIPE

Le kit P3NP (N-Terminal Procollagène III Peptide) ELISA est un dosage **immunologique colorimétrique utilisant la méthode sandwich en une étape ELISA**. Un anticorps monoclonal, immobilisé sur la microplaque, capture les protéines PIIINP contenues dans les calibrateurs et les échantillons, et les protéines liées sont ensuite reconnues par un deuxième anticorps monoclonal conjugué à la HRP (peroxydase de raifort). Les réactifs non liés sont éliminés pendant la procédure de lavage. La réaction colorimétrique est ensuite lancée par l'ajout d'un substrat de la HRP, le TMB (3,3', 5, 5' tétraméthylbenzidine). La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution acide ; la densité optique (DO) de chaque puits est mesurée à 450 nm. Les valeurs de la DO sont proportionnelles aux concentrations de protéines PIIINP contenues dans les calibrateurs et les échantillons.

4. RÉACTIFS

Chaque kit contient suffisamment de réactifs pour réaliser 96 tests. La date d'expiration est indiquée sur l'étiquette extérieure du kit.

Avant leur ouverture et jusqu'à la date d'expiration, tous les réactifs doivent être conservés entre 2 °C et 8 °C.

Une fois ouvert, le kit peut être utilisé dans un délai de 6 semaines si les réactifs sont conservés en respectant les instructions ci-dessous :

RÉACTIFS	SYMBOLES	QUANTITÉ	CONSERVATION APRÈS OUVERTURE
MICROPLAQUE : prêt à l'emploi. Anticorps monoclonal anti-PIIINP de souris immobilisé à la surface des puits.	MICROPLATE	1 plaque (96 puits) (pochette d'aluminium avec dessiccant)	Après ouverture, toutes les barrettes non utilisées peuvent être stockées pendant 6 semaines entre 2 °C et 8 °C, dans le sac en plastique fourni, correctement fermé, avec l'agent dessiccant.
CONJUGUÉ : prêt à l'emploi. Solution tampon contenant l'anticorps monoclonal anti-PIIINP de souris lié à la peroxydase de raifort, des immunoglobulines de souris, des stabilisateurs et un agent conservateur.	CONJ	1 flacon de 12 mL	Après ouverture, la solution doit être conservée entre 2 °C et 8 °C et utilisée dans un délai de 6 semaines.
DILUANT – CALIBRATEUR 0 (CAL 0) : prêt à l'emploi. Solution tampon contenant des protéines bovines, des agents conservateurs et un colorant jaune-orange.	DIL CAL0	1 flacon de 35 mL	Après ouverture, la solution doit être conservée entre 2 °C et 8 °C et utilisée dans un délai de 6 semaines.
CALIBRATEURS (CAL 1 – CAL 5) : lyophilisés. Solution tampon lyophilisée contenant du sérum de veau fœtal, des protéines bovines, des agents conservateurs et un colorant jaune-orange. 2,5 – 5 – 10 – 20 – 30 µg/L* Reconstituer avec 1 mL d'eau distillée, remplacer le capuchon, retourner plusieurs fois le flacon et passer au Vortex pour garantir une reconstitution complète.	CAL	5 flacons qs 1 mL	Après la reconstitution, ne pas conserver pendant plus de 3 heures à température ambiante. Conserver entre 2 °C et 8 °C pendant 1 semaine maximum ou diviser en aliquotes et congeler à une température inférieure à -16 °C pendant une durée de 6 semaines (1 étape de congélation maximum).
CONTRÔLES 1 ET 2 (bas et haut) : lyophilisés. Plasma humain lyophilisé +/- sérum de veau fœtal Reconstituer avec 0,25 mL d'eau distillée, remplacer le capuchon, retourner plusieurs fois le flacon et passer au Vortex pour assurer une reconstitution complète. Les valeurs seuils exactes d'acceptation sont imprimées sur l'étiquette de chaque flacon.	CONTROL	1 flacon chacun qs 0,25 mL	Après la reconstitution, ne pas conserver pendant plus de 3 heures à température ambiante. Conserver entre 2 °C et 8 °C pendant 1 semaine maximum ou diviser en aliquotes et congeler à une température inférieure à -16 °C pendant une durée de 6 semaines (1 étape de congélation maximum).
TAMPON PBS : comprimés. Solution tampon phosphate. Dissoudre 1 comprimé dans de l'eau distillée pour préparer 100 ml de tampon PBS. MISE EN GARDE : Pour préparer le tampon de lavage, ajouter 0,3 mL de TWEEN 20 pour 100 mL de tampon PBS et mélanger doucement. (Les 2 comprimés restants sont fournis si besoin).	BUF WASH	4 plaquettes de 3 comprimés chacune (quantité suffisante pour préparer 1 litre de solution tampon de lavage)	Une fois l'alvéole de la tablette ouverte, les comprimés doivent être immédiatement dissous.
TWEEN20 : Solution Tween-20.	TWEEN 20	1 flacon de 10 mL	Entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date d'expiration.
SUBSTRAT : prêt à l'emploi. Réactif contenant de la 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine (TMB).	SUBS TMB	1 flacon de 15 mL	Entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date d'expiration.
SOLUTION D'ARRÊT : prête à l'emploi. Solution d'acide sulfurique 0.5 M.	STOP SOL	1 flacon de 22 mL	Entre 2 °C et 8 °C jusqu'à la date d'expiration.
FILM ADHÉSIF POUR MICROPLAQUE		2	

*Les valeurs indiquées ci-dessus sont uniquement des valeurs cibles. La valeur réelle de chaque calibrateur est indiquée sur son étiquette.

5. PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

5.1. Mesures de sécurité

- Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de ce kit ont été testées avec des kits homologués et les résultats de ces tests se sont avérés négatifs pour les anticorps anti-VIH 1, anti-VIH 2 et anti-VHC et l'antigène HBs. Il est toutefois impossible de garantir totalement que ces produits sont incapables de transmettre l'hépatite, le VIH ou toute autre infection virale. Par conséquent toutes les matières premières d'origine humaine, y compris les échantillons prélevés à des fins de tests, doivent être traités comme potentiellement infectieux.
- Porter des gants jetables lors de la manipulation des réactifs du kit ou des échantillons et se laver les mains avec soin ensuite. Éviter toute éclaboussure.
- Décontaminer et éliminer les échantillons et tous les matériels potentiellement contaminés comme s'ils contenaient des agents infectieux. La meilleure méthode de décontamination à appliquer est le passage à l'autoclave à 121,5 °C, pendant au moins une heure.
- Lors de l'élimination des déchets, veiller à bien les diluer afin d'éviter la formation de tels produits.



DIL CAL0

CAL

AVERTISSEMENT

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée

5.2. Précautions de manipulation

- Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de la date d'expiration.
- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents. Les numéros de lot des réactifs sont attribués à un lot de kit spécifique. Ces informations sont détaillées dans la fiche du Rapport de contrôle de la qualité.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs et de l'eau. Respecter les durées d'incubation.

6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

6.1. Pré-analyse

- ✓ Ce kit permet de mesurer le taux de PIINP dans des échantillons de **sérum humain, de plasma EDTA ou hépariné**.

Deux études indépendantes ont été menées pour comparer les résultats obtenus avec le kit P3NP-ELISA sur des échantillons de sérum/plasma EDTA appariés (n=39) ou sérum/ plasma hépariné appariés (n=35).

Une analyse Passing-Bablok a été appliquée aux résultats et a fourni les équations suivantes :

- ✓ **[Plasma EDTA Conc µg/L] = 0.997 x [Sérum Conc µg/L] - 0.133 µg/L**, coefficient de corrélation de Pearson **r=0.99**
Les intervalles de confiance à 95% pour la pente et pour l'intercept étaient de 0.92-1.08 et -0.68 à 0.39µg/L pour les 39 échantillons dont les concentrations en PIINP étaient comprises entre 3.42 et 24.95µg/L dans le sérum.
- ✓ **[Plasma hépariné Conc µg/L] = 0.975 x [Sérum Conc µg/L] + 0.11 µg/L**, coefficient de corrélation de Pearson était de **r=0.98**
Les intervalles de confiance à 95% pour la pente et pour l'intercept étaient de 0.88-1.06 et -0.92 à 0.72µg/L pour les 35 échantillons dont les concentrations en PIINP étaient comprises entre 4.44 et 29.0µg/L dans le sérum.

- Les échantillons de sérum ou de plasma EDTA peuvent être laissés à température ambiante (18-25°C) pendant un maximum de 4 heures avant d'être utilisés pour mesurer la concentration de PIINP.
- Les échantillons de sérum ou de plasma EDTA peuvent être utilisés immédiatement ou conservés entre 2 °C et 8 °C pendant une durée maximale de 3 jours. Si le test n'est pas réalisé dans les 3 jours suivant le prélèvement, les échantillons doivent être divisés en aliquotes et conservés congelés à -20 °C.
- Après la décongélation, le plasma ou le sérum doit être mélangé délicatement. Éviter les congélations/décongélation successives.

6.2. Pré-dilution des échantillons et des contrôles (1/11)

- **Tous les échantillons ainsi que les contrôles du kit doivent être prédilué 11 fois** dans le diluant fourni dans le kit (par ex. 30 µL d'échantillon + 300 µL de diluant) **DIL CAL0** avant dosage. Mélanger délicatement à l'aide d'un Vortex.
- Si des taux élevés de protéine PIINP sont suspectés, des dilutions supplémentaires peuvent être réalisées.

7. PROCÉDURE DU TEST

7.1. Matériel requis

- Pipettes de précision ou tout équipement similaire avec des embouts jetables pour la distribution de 20, 50, 100, 200 et 1 000 µL. L'étalonnage de ces éléments doit être régulièrement contrôlé.
- Eau distillée.
- Tubes en plastique jetables.
- Mélangeur Vortex.
- Laveur de microplaque (en option).
- Agitateur de microplaque.
- Lecteur de microplaque, pouvant mesurer l'absorbance à 450 nm. En option, le lecteur peut être équipé d'un filtre capable de lire l'absorbance à une longueur d'onde comprise entre 610 et 650 nm (longueur de 620 nm recommandée). Cette deuxième lecture permet de corriger les imperfections de la microplaque.

7.2. Protocole

- Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (entre 18 °C et 25 °C) au moins 30 minutes avant leur utilisation. Les réactifs sont collectés et répartis dans les puits à température ambiante (entre 18 °C et 25 °C).
- Chaque étalon, contrôle ou échantillon doit être testé deux fois.
- Déterminer le nombre de puits requis pour le test et retirer toutes les barrettes inutilisées. Conserver le tout entre 2 °C et 8 °C dans le sachet en plastique fourni à cet effet et correctement refermé avec un agent desséchant.
- Reconstituer les flacons des calibrateurs et des contrôles. Veiller à vérifier que tout le lyophilisat est dissous et utilisé dans l'heure suivant la reconstitution.

7.2.1. Préparation de la solution de lavage **WASH**

- Pour obtenir des résultats fiables et reproductibles, il est conseillé d'exécuter les étapes de lavage en respectant les instructions. Le volume résiduel de solution de lavage doit être le plus faible possible. Il est conseillé d'utiliser un laveur de microplaque.

MISE EN GARDE ! Les comprimés **BUF WASH** sont prévus pour préparer une solution saline de tampon phosphate. Il est obligatoire d'ajouter **TWEEN 20** 0,3 mL de solution à chaque quantité de 100 mL de solution saline de tampon phosphate afin de constituer la solution tampon de lavage **WASH** mentionnée dans le protocole pendant les étapes de lavage.

- Dissoudre 1 comprimé **BUF WASH** dans de l'eau distillée pour préparer 100 mL de solution tampon PBS.
- Ajouter 0,3 mL de réactif **TWEEN 20** pour 100 mL de solution et mélanger délicatement.
- Étiqueter le récipient contenant cette solution de lavage en précisant **WASH** sur l'étiquette. Cette solution reste stable pendant 1 semaine entre 2 °C et 8 °C.

7.2.2. Instructions - Respecter l'ordre d'ajout des réactifs

Voir la dernière page pour la fiche de protocole du laboratoire. Il est nécessaire de lire l'intégralité de la notice avant d'utiliser la fiche de protocole du laboratoire.

Si nécessaire, diluer les échantillons avec des concentrations présumées élevées de PIINP ($> 30 \mu\text{g/L}$) en utilisant le réactif diluant **DIL CALO** fourni dans le kit.

1. Reconstituer les calibrateurs (1 mL) **CAL** et les contrôles (0,25 mL) **CONTROL** en ajoutant de l'eau distillée, replacer le capuchon, retourner plusieurs fois le flacon et le passer au mélangeur Vortex pour garantir une reconstitution complète.

Remarque : les calibrateurs sont prêts à l'emploi, NE PAS les prédiluer.

2. Préparer et numéroter une quantité suffisante de tubes à essai pour effectuer une prédilution des échantillons et des contrôles.
3. Déterminer le nombre de barrettes de microtitration de puits nécessaires pour le test. Retirer les barrettes inutilisées du support et les stocker entre 2°C et 8°C dans le sachet à fermeture adhésive correctement fermé.
4. **Prédiluer les échantillons et les contrôles selon un rapport de 1:11.**
 - a. Distribuer 300 μL de diluant **DIL CALO** dans les tubes en plastique
 - b. Ajouter 30 μL de chaque échantillon ou contrôle dans chaque tube et agiter doucement dans un mélangeur de type Vortex

Remarque : les échantillons et contrôles prédilués peuvent être conservés pendant 1 heure à température ambiante (entre 18°C et 25°C) avant le test ($>1 \text{ h}$ non testé).

5. Ajouter 100 μL de calibrateurs **CAL**, de contrôles **CONTROL** et d'échantillons dans les puits prévus à cet effet, en dupliquats.
6. Distribuer 100 μL de conjugué anticorps-HRP **CONJ** dans les puits.
7. Couvrir avec le film adhésif et laisser incuber pendant **3 h** à température ambiante (entre 18°C et 25°C) **sous agitation orbitale à 700 tr/min.**
8. Laver les puits en respectant la procédure suivante :
 - a. Retirer le contenu des puits
 - b. Verser 300 μL de solution de lavage **WASH**, préparée selon les instructions de la section 7.2.1.
 - c. Répéter 2 fois les étapes a. et b. pour obtenir un total de 3 cycles de lavage.
 - d. Terminer la procédure en aspirant. Le volume résiduel de solution de lavage doit être le plus faible possible. Il est possible de retourner la plaque et la tapoter doucement sur du papier absorbant pour éliminer tout liquide restant à l'intérieur des puits.
9. Distribuer **100 μL** de substrat TMB **SUBS TMB** dans tous les puits.

Important : Démarrer le temps d'incubation de 15 min à compter de la distribution du premier puits.

10. Couvrir avec le film adhésif et laisser incuber pendant **15 min** à température ambiante (entre 18°C et 25°C) **SANS agitation.** L'incubation à l'obscurité n'est pas nécessaire.
11. Arrêter la réaction en ajoutant **100 μL** de solution d'arrêt **STOP SOL** dans tous les puits.
12. Retirer le film adhésif et mesurer l'absorbance (DO) dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt :
Il est conseillé de nettoyer la partie inférieure extérieure des puits avec un chiffon doux non pelucheux afin d'éliminer les éventuelles traces de doigts ou taches.

➤ Effectuer une lecture à une longueur d'onde de 450 nm (en option: effectuer une lecture à une longueur d'onde de 620 nm).

8. CONTRÔLE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent que des échantillons de contrôle de la qualité soient utilisés dans chaque série de tests, afin de contrôler la qualité des résultats obtenus. Tous les échantillons doivent être traités de façon identique. Il est en outre recommandé d'effectuer une analyse des résultats en utilisant les méthodes statistiques appropriées.

9. RÉSULTATS

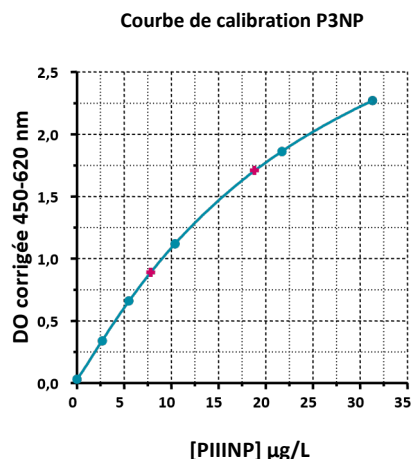
1. Correction de DO optionnelle* : soustraire la lecture à 620 nm de la lecture à 450 nm.

2. Pour chaque duplica, calculer l'absorbance moyenne (DO) des calibrateurs, des contrôles et des échantillons.
3. Construire une courbe de calibration en déterminant les valeurs de DO moyenne (corrigée*) à 450 nm des calibrateurs (axe y) en fonction de la concentration (axe x) indiquée sur le flacon.
4. Il est conseillé d'utiliser le modèle mathématique **logistique à 4 paramètres (4-PL)** pour calculer les courbes de calibration. D'autres fonctions de modélisation des données peuvent donner des résultats légèrement différents.

Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe. Le rapport de prédilution 1:11 est déjà calculé dans les concentrations de calibrateurs.

Exemple de données de test : à des fins d'illustration uniquement. Ne doit en aucun cas se substituer aux résultats obtenus en laboratoire.

	Concentration µg/l (voir les flacons)	DO corrigée* 450-620 nm
CAL0	0	0,02
CAL1	2,7 (exemple)	0,34
CAL2	5,5 (exemple)	0,66
CAL3	10,4 (exemple)	1,12
CAL4	21,7 (exemple)	1,86
CAL5	31,3 (exemple)	2,27
CONTROL 1	7,8 (exemple)	0,89
CONTROL 2	18,8 (exemple)	1,71



10. LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Les échantillons présentant une turbidité, une hémolyse, une hyperlipémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.
- Ne pas extrapoler les valeurs d'échantillons au-delà du dernier calibrateur. Diluer les échantillons concernés et relancer le test.

11. PERFORMANCES ANALYTIQUES

11.1. Plage de mesures du test

Les échantillons doivent être mesurés dans la plage située entre la limite inférieure de détection et la concentration la plus élevée de la plage de calibration.

11.2. Traçabilité

Les valeurs de PIIINP attribuées au kit P3NP-ELISA sont exprimées en microgrammes par litre (µg/L) et sont standardisées avec un étalon interne constitué à partir d'échantillons de sérum humain dosés selon une méthode de référence quantitative.

11.3. Précision

11.3.1. Intra-essai

La variation intra-essai (intra-run) a été déterminée par 31 mesures de 3 échantillons sériques couvrant l'ensemble de la plage de mesures de la courbe de calibration.

Précision intra-essai			
Échantillon	1	2	3
n	31	31	31
Valeur moyenne (µg/L)	5,2	13,4	25,5

CV (%)	2,2	2,4	3,6
---------------	------------	------------	------------

11.3.2. Inter-essai

La variation inter-essais (inter-runs) a été déterminée en utilisant 3 échantillons sériques mesurés sur 8 cycles, en dupliquas.

Précision inter-essais

Échantillon	1	2	3
n	8	8	8
Valeur moyenne (µg/L)	5,3	13,1	25,0
CV (%)	6,5	8,0	7,3

11.4. Limite de détection

- La limite de détection (LOD ou sensibilité analytique) du kit P3NP-ELISA est définie comme la plus basse concentration détectable qui soit discriminable de 0 avec une probabilité à 95 %, calculée en ajoutant 2 écarts-types à la moyenne de 30 analyses répétées du calibrateur 0 (CAL0).

Sensibilité analytique (Limite de Détection)

LOD 2σ	0,036 µg/L
---------------	-------------------

- La limite de dosage (LOQ ou sensibilité fonctionnelle) du kit P3NP-ELISA est définie comme la concentration mesurée par le profil d'imprécision avec un CV inter-essai équivalent à 12,5 %. Elle a été évaluée en testant 9 échantillons sériques en double, sur 8 cycles. La moyenne, l'écart-type et le % de CV ont ensuite été déterminés pour chaque échantillon et la fonction de variance de puissance à 3 paramètres a été utilisée pour le lissage des données.

Sensibilité fonctionnelle (Limite de Quantification)

LOQ - CV 12,5 %	2,2 µg/L
------------------------	-----------------

11.5. Récupération d'antigène

Les solutions de PIIINP des calibrateurs 2 à 5 ont été mélangées selon un rapport de 1:1 à 2 pools d'échantillons sériques avec différentes concentrations initiales en PIIINP. Chaque échantillon (non enrichi ou enrichi) a fait l'objet d'un test en double exemplaire dans un seul cycle. Les concentrations de PIIINP ont été mesurées et les pourcentages de récupération ont été calculés.

Récupération

Échantillon	1	2
Concentration (µg/L)	3,0	7,1
Récupération moyenne (%)	91	95
Intervalle de récupération (%)	88-92	92-97

11.6. Dilution – Linéarité

Des études ont été effectuées pour évaluer la linéarité du dosage en utilisant 4 échantillons sériques de différentes concentrations. Les échantillons ont été dosés purs et dilués en série avec DIL-CAL0 (facteur de dilution réduit à 1:16).

Dilution

Échantillon	3	4	5	6
Concentration (µg/L)	27,7	22,1	24,1	24,5
Intervalle de dilution	1:2 à 1:16	1:2 à 1:16	1:2 à 1:16	1:2 à 1:16

Récupération moyenne (%)	101	104	99	102
Plage de récupération (%)	94-107	100-109	96-101	100-104

Linéarité

Ordonnée à l'origine	0,18	0,30	-0,11	0,13
Pente (Y=mesuré)	1,00	1,00	1,00	0,99
R²	0,99	0,99	0,99	0,99

Ces résultats démontrent une bonne linéarité du test de dilution sur l'intervalle de mesure de ce dosage.

11.7. Spécificité

La spécificité du dosage est garantie par l'utilisation de deux anticorps monoclonaux complémentaires. Les anticorps monoclonaux utilisés dans le kit sont spécifiques du peptide N-terminal procollagène III. Le peptide PIIINP peut être dégradé par protéolyse en fragments (col 1) qui ne sont pas reconnus par le kit P3NP-ELISA.

11.8. Effet crochet

Aucun effet crochet n'a été observé avec ce dosage, testé sur des concentrations allant jusqu'à 200 µg/L.

11.9. Interférences

Une étude d'interférence a été effectuée selon la directive CLSI EP17-A2. Des mesures ont été réalisées en utilisant 4 à 6 répliquas avec 2 échantillons (zone basse et moyenne de la courbe de calibration). Une interférence non significative a été définie comme un écart de ± 10 % par rapport au contrôle (échantillon non enrichi). Aucune interférence n'a été observée lorsque les échantillons plasmatiques ont été testés avec l'une des substances suivantes :

- Triglycérides de plasma EDTA hyperlipidémique (échantillon humain – 743,4 mg/dL TG total et dilué de moitié)
- Triglycérides d'une solution commerciale Intralipid (30 mg/mL)
- Albumine humaine (60 mg/mL)
- Bilirubine (0,15 mg/mL)
- Hémoglobine humaine (2 mg/mL)
- Méthotrexate (2 mM)
- Acide biliaires (jusqu'à 35 µM)

REMARQUE : Les tests ont également montré que le Triton X-100 provoquait une légère interférence (-14 % de biais maximum) avec ce test lorsque les échantillons sont enrichis avec 0,1 % de cette substance.

MISE EN GARDE : l'immunodosage est protégé contre des interférences potentielles provoquées par des **anticorps hétérophiles** tels que les HAMA (anticorps humains anti-souris) et les facteurs rhumatoïdes en ajoutant une protection. Néanmoins, nous ne pouvons pas garantir qu'il n'existera jamais de résultats « faux positifs » ou « faux négatifs » du fait de la présence d'anticorps hétérophiles dans un échantillon de patient.

12. VALEURS NORMALES ATTENDUES

Afin de déterminer la plage normale des valeurs de P3NP-ELISA, 120 échantillons de plasma EDTA de sujets présumés sains ont été analysés à l'aide du kit P3NP-ELISA.

Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous (exprimés en µg/L) :

Valeurs normales attendues pour le test P3NP-ELISA (µg/L PIIINP)

Moyenne	Médiane	5° centile	95° centile	Min	Max
4,9	4,6	2,9	8,1	2,1	13,1

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales. Les valeurs données ci-dessous sont indicatives.

13. COMPARAISON DES MÉTHODES

Une étude a été menée pour comparer les résultats du kit P3NP-ELISA à ceux du test RIA-gnost[®] PIIP (Cisbio Bioassays) en utilisant 37 échantillons sériques.

- L'équivalence de concentration rapportée par le dosage RIA-gnost[®] PIIP relativement à l'unité exprimée en µg/L a été calculée en multipliant les résultats du kit RIA (U/mL) par un facteur de 8 afin d'obtenir la correspondance en µg/L, conformément aux instructions du kit RIA-gnost[®] PIIP.

Une analyse de régression à l'aide de la méthode de Passing et Bablok a été effectuée sur ces échantillons, et a permis d'obtenir l'équation suivante :

$$[\text{P3NP- ELISA}] (\mu\text{g/L}) = 0,94 \times [\text{RIA-gnost PIIP}] (\mu\text{g/L}) + 1,12 \mu\text{g/L}$$

Le coefficient de corrélation de Pearson est $r = 0,962$

L'intervalle de confiance à 95 % de la pente est compris entre 0,81 et 1,04, et l'intervalle de confiance à 95 % pour l'ordonnée à l'origine est compris entre 0,41 et 2,00 µg/L pour les 37 échantillons de patients ayant des concentrations de PIIP comprises entre 3,23 et 24,9 µg/L (telles que mesurées par le kit P3NP-ELISA)

- Sans appliquer de facteur de conversion au test RIA-gnost[®], l'équation suivante a été obtenue :

$$[\text{P3NP- ELISA}] (\mu\text{g/L}) = 7,76 \times [\text{RIA-gnost PIIP}] (\text{U/mL}) + 0,99 \text{ U/mL}$$

Le coefficient de corrélation de Pearson est $r = 0,962$

L'intervalle de confiance à 95 % de la pente est compris entre 6,89 et 8,66, et l'intervalle de confiance à 95 % pour l'ordonnée est compris entre -0,04 et 1,66 µg/L pour les 37 échantillons de patients ayant des concentrations de PIIP comprises entre 3,23 et 24,9 µg/L (telles que mesurées par le kit P3NP-ELISA)

14. BIBLIOGRAPHIE

1. Fernandes f. et al. *J Clin Gastroenterol* 2015;49:235–241
2. Holt et al. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013; 17(Suppl1): S18-S22.
3. Pathirana D, et al. *JEADV* 2009; 23 (Suppl. 2), 5-70.
4. Potts et al. *Br J Dermatol.* 2017 ;177(3): 637-44
5. Safdar et al, *Int J Cardiovasc Res* 2015, 4:2
6. Tanwar S, et al. *Hepatology.* 2013 Jan;57(1):103-11
7. Van Der Reeks et al. *Br J Dermatol.* 2017; 177(5):1454-57

P3NP (N-Terminal Procollagen III Peptide) ELISA

TECAN.

FICHE DE PROTOCOLE DE LABORATOIRE

Ne pas utiliser cette fiche sans avoir lu l'intégralité de la notice.

Si nécessaire, diluer les échantillons avec des concentrations présumées élevées de PIIINP en utilisant le réactif diluant **DIL** **CALO** fourni dans le kit.

1. RECONSTITUER les calibrateurs (1mL) et contrôles (0.25 mL) avec de l'eau distillée (dH₂O)

CAL **CONTROL**

Remarque: les calibrateurs sont prêts à l'emploi, NE PAS les prédiluer.

2. PREDILUER les échantillons et les contrôles selon un rapport de 1:11

DIL **CALO** **SAMPLE** **CONTROL**

Préparer une quantité suffisante de tubes pour effectuer l'ensemble des pré-dilutions

↓ Distribuer 300 µL de diluant dans chaque tube

↓ Ajouter 30 µL de chaque échantillon ou contrôle dans les tubes et mélanger doucement sur un agitateur de type Vortex

3. AJOUTER LES ECHANTILLONS DANS LA MICROPLAQUE

SAMPLE **CAL** **CONTROL**

↓ Ajouter 100 µL de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons prédilués dans les puits (distribution en dupliques).

4. DISTRIBUER LE CONJUGUE

CONJ

↓ Distribuer 100 µL de conjugué anticorps-HRP dans les puits.

5. INCUBER

Couvrir avec le film adhésif et laisser incubé pendant 3h à température ambiante (entre 18°C et 25°C) sous agitation à 700 tr/min

6. LAVAGE (voir 7.2.1)

WASH

Préparer la solution de lavage, pour 100 mL = 1 comprimé + 100 mL d'eau distillée + 0.3 mL de solution Tween20

Réaliser 3 cycles de lavage Aspirer → Distribuer 300 µL de solution de lavage

Terminer la procédure en aspirant. Le volume résiduel de la solution doit être le plus faible possible. Il est possible de retourner la plaque et la tapoter doucement sur du papier absorbant pour éliminer tout liquide restant à l'intérieur des puits.

7. DISTRIBUER LE SUBSTRAT

SUBS **TMB**

↓ Distribuer 100 µL de substrat TMB dans tous les puits et démarrer le temps d'incubation de 15 min à compter du remplissage du premier puits.

8. INCUBER

Couvrir avec le film adhésif et laisser incubé pendant 15 min à température ambiante (entre 18 et 25°C) sans agitation. L'incubation à l'obscurité n'est pas nécessaire.

9. DISTRIBUER LA SOLUTION D'ARRÊT

STOP **SOLN**

↓ Distribuer 100 µL de solution d'arrêt dans tous les puits.

10. LECTURE

↻ Effectuer une lecture à 450 nm dans un délai de 30 minutes – Utiliser le modèle logistique à 4 paramètres (4PL) pour le traitement des données.

Facultatif : effectuer une lecture à longueur d'onde de 620nm

Pré-dilution selon un rapport de 1:11



3 h
± 700 rpm



15 min



450 nm



Ciblo Biosciences - Parc Marcel Boileux - BP 84175 - 30200 Codreuil / France
Phone: +33 (0) 4 68 78 87 00 - Fax: +33 (0) 4 68 78 87 50 - E-mail: Ciblo.Iva@revvity.com



IBL International GmbH - Flughafenstrasse 62a - 22335 Hamburg, Germany
Phone: +49 (0) 40 63 28 91-0 - Fax: +49 (0) 40 63 28 91-11 - E-mail: IBL@tecan.com; www.tecan.com/ibl



FRA

Modifications par rapport à la version précédente :
Mise à jour de l'adresse email de l'assistance "in vitro".

ENG

Changes from the previous version:
Update of the IVA email address.

DEU

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion:
Aktualisierte E-Mail-Adresse für "In-vitro"-Support

FRA

ENG

DEU

	Explication des symboles	Explanation of symbols	Erläuterung der Symbole
	Limite de température	Temperature limitation	Temperaturbegrenzung
LOT	Code du lot	Batch code	Chargencode
	Utiliser jusqu'au	Use by	Verwendbar bis
	Consulter la notice d'utilisation	Consult instructions for use	Das Handbuch zu Rate ziehen
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	In vitro medical device	In-Vitro Diagnostische Anwendung
	Fabricant	Manufacturer	Hersteller
	Distributeur	Distributor	Verteiler
REF	Référence du catalogue	Catalogue number	Katalog Nr.
	Suffisant pour	Sufficient for	Ausreichend für
	Conserver à l'abri de la lumière du soleil	Keep away from sunlight	Vor Sonnenlicht schützen
	Risques biologiques	Biological Risks	Biogefährdung
CONJ	Conjugué	Conjugate	Komplex
CAL	Calibrateur	Calibrator	Kalibrator
CONTROL	Contrôle	Control	Kontrolle
TWEEN 20	Solution concentrée	Concentrated solution	Konzentrierte Lösung
MICROPLATE	Microplaque	Microplate	Mikrotiterplatte
DIL CAL	Diluant	Diluent	Verdünnungs-mittel
BUF WASH	Tampon	Buffer	Puffer
SUBS TMB	Substrat	Substrate	Substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt	Stop solution	Stopplösung