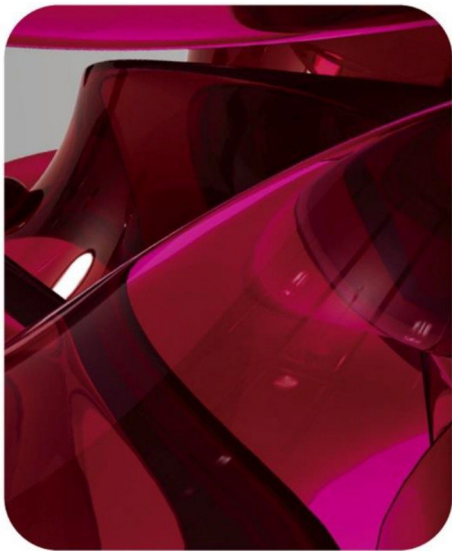
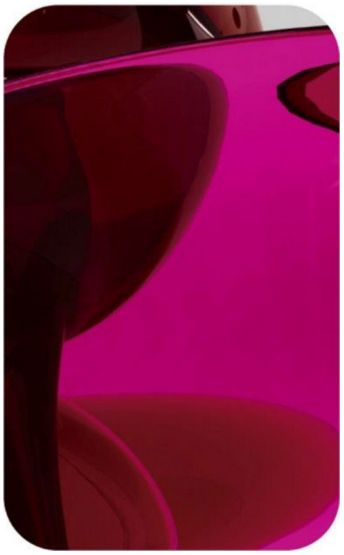
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS


AESKUBLOTS®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MODE D'EMPLOI

AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG

Ref 401006

CE

Mode d’emploi

Table des matières

1 Usage prévu 1
2 Application clinique et principe du test 1
3 Contenu du kit 5
4 Stockage et durée de conservation 5
5 Précautions d’emploi et introduction générale 6
6 Prélèvement, manipulation et stockage des échantillons 7
7 Procédure de test 8
8 Évaluation quantitative 10
9 Données techniques 11
10 Données de performance 12
11 Mise au rebut 19
12 Note destinée à l’utilisateur (Union européenne) 19
13 Bibliographie 20
14 Symboles réglementaires 21

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

1 Usage prévu

***AESKUBLOTS*® Gluten Related Disorders IgG** est un test immuno-enzymatique sur membrane destiné à la détection quantitative des anticorps de la sous-classe IgG dirigés contre la gliadine, le DGP, la tTG, la tTG néo, la TG3, la mTG néo, la mTG et la Frazer's Fraction dans le sérum ou le plasma humain. Les antigènes sont déposés sur une membrane de nitrocellulose à des endroits précis de manière à former des lignes.

Ce test offre une aide au diagnostic des troubles liés au gluten, tels que la maladie cœliaque ou la sensibilité au gluten non cœliaque. Ce test ne permet pas d'analyser les échantillons de patients suivant un régime sans gluten.

Le kit de test est réservé à un usage professionnel en laboratoire.

2 Application clinique et principe du test

Les troubles liés au gluten (anglais: Gluten Related Disorders (GRD)) sont des maladies systémiques induites par le gluten parmi lesquelles figurent, entre autres, la maladie cœliaque (anglais: Celiac Disease (CD)), la sensibilité au gluten non cœliaque (anglais: non-celiac gluten sensitivity (NCGS)), la dermatite herpétiforme (DH) et l'allergie au blé.

Les troubles liés au gluten peuvent être classés en plusieurs catégories :

- Maladies auto-immunes : maladie cœliaque (CD), dermatite herpétiforme (DH).
- Maladies non auto-immunes, non allergiques : trouble de cause inconnue, probablement immunomodulé : sensibilité au gluten non cœliaque (NCGS).
- Maladies allergiques : allergie alimentaire (IgE-médiée et non IgE-médiée), anaphylaxie alimentaire induite par l'effort (anglais: wheat-dependent exercise-included anaphylaxis (WDEIA)), asthme du boulanger, eczéma de contact.

Maladie cœliaque

La maladie cœliaque est un trouble fréquemment inflammatoire de l'intestin grêle avec possibilité de manifestation systémique, déclenché par la consommation d'aliments contenant du gluten. Substance visco-élastique, le gluten est composé de protéines. On le retrouve dans différents types de céréales, notamment le blé, l'orge et le seigle. La principale protéine responsable du développement de la maladie cœliaque est la gliadine.

La maladie cœliaque touche environ 0,5 à 1,0 % de la population, avec une tendance à la hausse, et peut survenir à tout âge. À l'heure actuelle, les adultes et les enfants sont affectés en proportions à peu près égales. Outre l'inflammation typique de la muqueuse de l'intestin grêle, les personnes touchées présentent également des symptômes tels que la fatigue, des douleurs abdominales et des diarrhées, une perte de poids, une anémie, des problèmes de fertilité, une petite taille et une ostéoporose en raison de la malabsorption des nutriments.

Il existe une prédisposition génétique à la maladie : les patients sont porteurs des gènes HLA-DQ2 et/ou DQ8. La maladie cœliaque peut également être causée par la gliadine présente dans la nourriture, qui n'est pas totalement absorbée par l'intestin. Chez les patients atteints de la maladie cœliaque, les peptides de la gliadine non absorbée peuvent traverser l'épithélium de l'intestin grêle

et atteindre le tissu conjonctif sous-jacent. La désamination et la transamination (formation de complexes) des fragments de protéines sont catalysées par la transglutaminase tissulaire. Pendant la désamination, la glutamine, qui est un acide aminé, se transforme en acide glutamique. Étant donné la prédisposition génétique, ces peptides modifiés sont davantage présentés au système immunitaire par les cellules présentatrices d'antigènes. Cela induit la production d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques de la gliadine désaminée. Du fait de ce qu'on appelle « epitope spreading », la réaction immunitaire se propage alors à des épitopes secondaires, en l'occurrence l'enzyme tTG de l'organisme. Ce processus entraîne une inflammation et des lésions de la muqueuse de l'intestin grêle, reconnaissables histologiquement par une atrophie villositaire et une hyperplasie des cryptes intestinales.

La biopsie de l'intestin grêle est toujours considérée comme l'examen de référence. La maladie cœliaque peut être classée en trois types selon la sévérité de l'histopathologie intestinale :

Marsh I : augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) avec architecture muqueuse normale.

Marsh II : hyperplasie supplémentaire des cryptes avec villosités normales

Marsh III : augmentation des LIE, hyperplasie des cryptes, dégénérescence des cellules épithéliales et atrophie villositaire.

Les personnes atteintes de la maladie cœliaque qui suivent un régime sans gluten tout au long de leur vie présentent une amélioration de leurs symptômes. La sérologie cœliaque se normalise dans un délai de 3 à 12 mois (les anticorps ne sont plus détectables) et l'inflammation intestinale diminue également, bien que lentement.

Dermatite herpétiforme

La dermatite herpétiforme est une manifestation cutanée de la maladie cœliaque. Les personnes atteintes présentent toujours des démangeaisons très sévères et douloureuses au stade aigu. Les premières manifestations cutanées se traduisent par de petites lésions papuleuses rougeâtres qui se transforment en vésicules.

Le diagnostic s'effectue par détection optique en immunofluorescence de dépôts granulaires d'IgA sur la peau non affectée. Dans ce cas, une biopsie de l'intestin grêle doit également être réalisée, car les patients présentent les mêmes modifications de la muqueuse de l'intestin grêle que ceux atteints de la maladie cœliaque, même s'ils présentent peu de symptômes. Dans cette forme particulière de la maladie cœliaque, l'organisme produit, entre autres, des auto-anticorps dirigés contre la transglutaminase (TG3) du tissu épidermique, qui sont des marqueurs sérologiques bien établis.

Sensibilité au gluten non cœliaque (NCGS)

Il n'existe pas encore de définition officielle de la NCGS. Ce trouble se caractérise par des symptômes gastro-intestinaux non spécifiques et des symptômes extra-intestinaux qui surviennent après la consommation d'aliments contenant du gluten. L'amélioration significative des symptômes dans le cadre d'un régime sans gluten et l'exclusion indubitable de la maladie cœliaque sont des conditions préalables au diagnostic de la NCGS.

La physiopathologie n'a pas encore été totalement élucidée. Cependant, des études suggèrent que non seulement le gluten, mais aussi et surtout les inhibiteurs de l'α-amylase/trypsine (ATI), présents à de fortes concentrations dans les variétés de blé modernes, pourraient jouer un rôle clé dans la pathogenèse.

Le tableau clinique de la NCGS est caractérisé par des symptômes gastro-intestinaux non spécifiques et ressemble donc à celui de la maladie cœliaque et du syndrome du côlon irritable. Les symptômes suivants peuvent être observés : douleurs abdominales, diarrhées, ballonnements, nausées, vomissements, maux de tête, gêne musculaire ou fatigue chronique.

Si les antécédents médicaux indiquent une corrélation temporelle entre la consommation de gluten et les symptômes, il faut d'abord exclure d'autres troubles liés au gluten, tels que la maladie cœliaque et l'allergie au blé, pour établir un diagnostic. Si la maladie cœliaque et l'allergie au blé ne sont pas à l'origine des symptômes, un régime sans gluten ni produits à base de blé peut être instauré. La diminution nette et persistante des symptômes indique la présence d'une NCGS.

Anticorps dirigés contre les substances suivantes :

- **Gliadin:** une élévation significative des anticorps dirigés contre la gliadine est observée chez les personnes ne souffrant pas de maladie cœliaque, mais présentant une ulcération buccale. Ils sont souvent présents en cas de MC, à un stade infraclinique à précoce de la maladie, mais aussi chez certains individus non atteints par la maladie.

- **DGP (peptides désaminés de la gliadine):** selon des études récentes, les anticorps anti-gliadine de patients atteints de la maladie cœliaque se lient à un nombre très limité d'épitopes spécifiques sur la molécule de gliadine. De plus, la désamination sélective de la gliadine par la transglutaminase tissulaire renforce la liaison des anticorps anti-gliadine. Par conséquent, les tests qui utilisent des peptides désaminés et définis ont une précision diagnostique supérieure à celle des tests anti-gliadine précédents.

- **tTG:** enzyme libérée lors de lésions cellulaires et qui participe à la réparation des tissus, la tTG (transglutaminase tissulaire) permet un diagnostic plus simple et plus fiable de la maladie cœliaque. Les anticorps anti-tTG présentent une sensibilité et une spécificité plus élevées pour la maladie cœliaque que les anticorps anti-gliadine. Ils sont fortement corrélés à l'activité de la maladie.

- **tTG neo:** la réticulation de la tTG (transamination) avec des peptides de la gliadine induit la formation de néo-épitopes avec la tTG. Comme la structure de ces néo-épitopes est plus similaire aux épitopes physiologiques qu'aux antigènes utilisés précédemment, l'antigène tTG néo-épitope permet une augmentation significative de la sensibilité et de la spécificité du test. Des études ont également démontré que la tTG néo-épitope peut être utilisée comme marqueur de la dermatite herpétiforme.

- **TG3:** la transglutaminase 3, ou transglutaminase épidermique, est exprimée dans l'épiderme. Les mutations du gène TGM3 entraînent, entre autres, le syndrome des cheveux incoiffables et la dermatite herpétiforme (ou maladie de Dühring-Brocq). Cette dernière est une maladie de la peau appartenant au groupe des dermatoses bulleuses auto-immunes. Elle se manifeste par des vésicules et des nodules visibles prurigineux et est due notamment à la maladie cœliaque. Le TGM3 est un marqueur très sensible pour diagnostiquer la maladie de Dühring-Brocq et peut améliorer le diagnostic.

- **mTG neo:** la transglutaminase microbienne (mTG) est souvent utilisée comme additif dans l'industrie alimentaire. Comme la tTG, la mTG est capable d'établir des liaisons transversales avec des peptides de la gliadine et peut ainsi former ce qu'on appelle des néo-épitopes de la mTG. Des anticorps anti-mTG néo-épitope peuvent également être observés chez les patients atteints de la maladie cœliaque et sont corrélés au score de Marsh. Des néo-épitopes de la mTG sont également présents dans d'autres troubles liés au gluten, comme la NCGS.

- **mTG:** la transglutaminase microbienne (mTG) est souvent utilisée comme additif dans l'industrie alimentaire. Elle est la principale cause de la formation des néo-épitopes de la mTG, qui sont suspectés d'être un autre marqueur de la maladie cœliaque. Les anticorps dirigés contre l'enzyme elle-même sont toutefois très rares.

- **Frazer's Fraction:** il s'agit de la gliadine qui a été digérée sous l'action de la pepsine et de la trypsine. Dès 1959, il a été démontré par Frazer *et al.* que l'ingestion par voie orale de la Frazer's Fraction était nocive pour les patients atteints de maladie cœliaque. Selon leur hypothèse, un mélange naturel de peptides de gliadine augmente considérablement la sensibilité et la spécificité des anticorps anti-gliadine détectés par le test. Cela n'a toutefois pas encore été prouvé.

Principe du test

Les antigènes sont disposés sous forme de lignes sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée de manière à éviter les réactions non spécifiques. Les bandelettes de test contenant des antigènes spécifiques positionnés de façon précise sont incubées dans des échantillons de sérum/plasma dilués au 1/101^{e}. S'ils sont présents dans l'échantillon, les anticorps se lient à l'antigène. La fraction non liée est éliminée à l'étape suivante. Ensuite, des immunoglobulines anti-humaines conjuguées à la peroxydase de raifort (conjugué), sont incubées et réagissent avec le complexe antigène-anticorps des échantillons. Le conjugué non lié est éliminé à l'étape suivante. Après l'ajout de substrat TMB, il est transformé par réaction enzymatique en un précipité bleu. La réaction est stoppée au moyen d'eau distillée.

3 Contenu du kit

À RECONSTITUER				
Composant	**Quantité**	**Couleur du bouchon**	**Couleur de la solution**	**Description / Contenu**
Réactif de blocage	2 x pour 10 ml de concentré	Blanc	s.o.	Lait écrémé en poudre pour la préparation de 2 x 10 ml de tampon d'échantillon
Tampon de lavage (20x)	1 x 50 ml	Blanc	Incolore	Concentré 20 x pour la préparation de 1 l de tampon Tris, pH 6,9 ± 0,2
PRÊT À L'EMPLOI				
Composant	**Quantité**	**Couleur du bouchon**	**Couleur de la solution**	**Description / Contenu**
Conjugué IgG	1 x 15 ml	Bleu	Incolore	Immunoglobuline G (IgG) anti-humaine, conjuguée à la peroxydase de raifort
Substrat TMB	1 x 15 ml	Noir	Incolore	TMB/H_2O_2 stabilisé
Bandelettes de test	24 bandelettes	Code couleur: bleu/noir	s.o.	Antigènes enrobés, voir Usage prévu
Pincette	1 de chaque	s.o.	s.o.	s.o.
Plateau d'incubation	3	s.o.	s.o.	s.o.
Étiquettes pour tampon d'échantillon	2	s.o.	s.o.	s.o.
Set card	1 pcs.	N/A	N/A	N/A
INFORMATIONS RELATIVES AU PRODUIT				
Certificat de contrôle qualité			1 pièce	
Mode d'emploi			1 pièce	
MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI				
Dispositif HELIA® Automated Blot System d'Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG, éprouvette graduée de 1000 ml, pipette ou éprouvette graduée de 10 ml, micropipettes (15, 1000 µl), papier absorbant ou papier filtre. Nos tests sont conçus pour être utilisés avec de l'eau purifiée, conformément à la définition de la Pharmacopée des États-Unis et de la Pharmacopée européenne.				

4 Stockage et durée de conservation

Conserver les réactifs et les bandelettes test à une température comprise entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F dans leur emballage d'origine. Une fois préparés, le tampon de lavage reconstitué ainsi que les bandelettes ouvertes, le conjugué et la TMB restent stables pendant six semaines à une température comprise entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. Le réactif bloquant reconstitué est stable pendant 3 semaines à une température comprise entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F. Les réactifs et les bandelettes doivent impérativement être utilisés avant la date d'expiration indiquée sur chaque composant. Ne pas utiliser les composants après la date d'expiration. Éviter toute exposition intense de la solution de TMB à la lumière.

5 Précautions d'emploi et introduction générale

5.1 Données relatives aux risques pour la santé

Ce produit est réservé à un USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO. Par conséquent, le kit ne peut être utilisé que par un personnel qualifié et dûment formé aux méthodes de diagnostic in vitro.

Tous les composants du kit sont classés conformément au règlement (CE) n° 1272/2008 [CLP]. Se reporter à la fiche de données de sécurité (FDS) pour plus d'informations sur les ingrédients.

Les substances répertoriées dans la Liste des substances extrêmement préoccupantes (SVHC) candidates en vue d'une autorisation de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) ne sont pas des composants intentionnels de ce produit. En principe, ces substances ne devraient donc pas être contenues dans ce produit dans des proportions ≥ 0,1 %.

Les réactifs doivent être conservés en lieu sûr et tenus hors de portée des enfants.

Plus particulièrement, ce mélange ne contient aucune substance à des concentrations ≥ 0,1 %, classée comme PBT (persistante, bioaccumulable et toxique) ou vPvB (très persistante et très bioaccumulable).

Les échantillons des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés conformément aux lois nationales. Les échantillons des patients et les autres matières potentiellement infectieuses doivent être décontaminés à l'issue du test.

5.2 Instructions d'utilisation générales

Afin de différencier les tests quantitatifs ***AESKUBLOTS***® disponibles, un code couleur est apposé au-dessus de la ligne de contrôle des bandelettes :

Code couleur	AESKUBLOTS®
bleu/jaune	Gluten Related Disorders IgA
bleu/noir	Gluten Related Disorders IgG

Si les informations sur le produit, y compris l'étiquetage, sont incorrectes, veuillez contacter le fabricant ou le fournisseur du kit de test.

Le réactif de blocage et le tampon de lavage peuvent être remplacés par ceux d'un autre lot ou kit de test. Tous les autres composants sont spécifiques à chaque kit de test et ne doivent pas être remplacés.

Ne pas utiliser de récipients en polystyrène pour manipuler le conjugué.

Pour une performance optimale du test, amener tous les composants à température ambiante (20-32 °C/68-89,6 °F) avant utilisation, mélanger soigneusement et respecter le schéma d'incubation recommandé. Le test peut être réalisé de manière entièrement automatique à l'aide du **HELIA**® **Automated Blot System** d'Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG.

Ne jamais exposer les composants à une température supérieure à 37 °C / 98,6 °F.

Toujours pipeter la solution de substrat avec des embouts neufs. Protéger le réactif de la lumière. Ne jamais pipeter le conjugué avec des embouts préalablement utilisés avec d'autres réactifs.

L'intensité chromatique des bandes ne correspond pas nécessairement aux titres des anticorps déterminés à l'aide d'autres méthodes de référence.

Même les échantillons provenant de donneurs apparemment sains peuvent contenir des auto-anticorps.

En cas de concentration élevée de complexes immuns ou de tout autre agrégat d'immunoglobulines dans un échantillon, des résultats faux positifs dus à des liaisons non spécifiques ne sont pas à exclure.

Un diagnostic clinique définitif ne doit pas s'appuyer uniquement sur les résultats du test effectué, mais doit être posé par le médecin en tenant compte de l'ensemble des observations cliniques et des analyses biologiques. Il est impératif de confirmer le diagnostic avec d'autres méthodes.

Par ailleurs, il convient de noter que dans le cadre d'un régime sans gluten, les anticorps spécifiques de la maladie cœliaque diminuent considérablement jusqu'à devenir indétectables.

6 Prélèvement, manipulation et stockage des échantillons

Utiliser de préférence des échantillons de sérum/plasma fraîchement prélevés. Les prélèvements de sang doivent être conformes aux exigences nationales. Ne pas utiliser d'échantillons ictériques, lipémiques, hémolysés ou contaminés par des bactéries. Les particules contenues dans le sérum/plasma doivent être éliminées par centrifugation à faible vitesse (<1 000 x g). Les échantillons de sang doivent être prélevés dans des tubes propres, secs et vides.

Après la séparation, les échantillons de sérum/plasma doivent être utilisés dans les 8 heures. Ils peuvent également être conservés dans des flacons hermétiquement fermés pendant 48 jours maximum à une température comprise entre 2-8 °C / 35,6-46,4 °F ou congelés à -20 °C / -4 °F pendant des périodes plus longues. Éviter de congeler et de décongeler les échantillons à plusieurs reprises (Thomas : Labor und Diagnose ; CLSI Guideline GP44-A4). Ne pas utiliser d'échantillons inactivés thermiquement (56 °C/132,8 °F).

7 Procédure de test

7.1 Préparations préalables

Vérifier l'absence de formation de cristaux de sel dans le concentré. Le cas échéant, dissoudre les cristaux en chauffant légèrement le concentré. En général, la température ambiante est suffisante.

Diluer le tampon de lavage concentré au 1/20^{e} avec de l'eau distillée (p. ex., 50 ml + 950 ml).

Préparation du tampon d'échantillon : ajouter 10 ml de tampon de lavage à un flacon de réactif de blocage et bien mélanger.

Placer les bandelettes de test dans le bon sens (ligne de contrôle et code couleur vers le haut) dans les puits d'incubation à l'aide d'une pincette (ne pas toucher les bandelettes de test avec les mains). Conserver les bandelettes de test inutilisées dans un endroit frais (2-8 °C/35,6-46,4 °F), dans leur boîte hermétiquement fermée et dans un sachet étanche. Charger le dispositif conformément aux spécifications du **HELIA® Automated Blot System**.

Remarques importantes :

Le test peut être réalisé de manière entièrement automatique à l'aide du **HELIA® Automated Blot System** d'Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG. Le test correspondant est effectué avec le programme : 401005 GRD IgA.

Le certificat d'analyse spécifique au lot doit être utilisé pour chaque lot.

7.2 Étapes de test manuel

Remarques importantes :

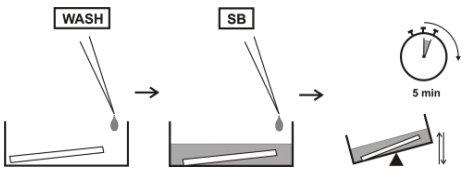
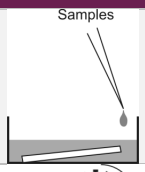
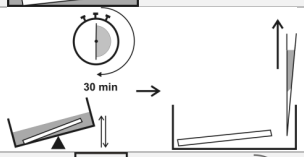
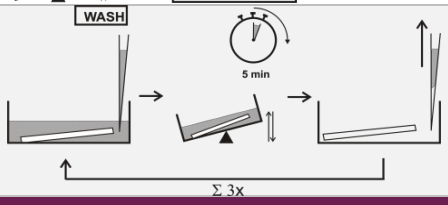
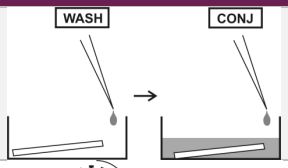
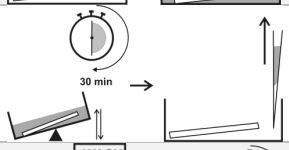
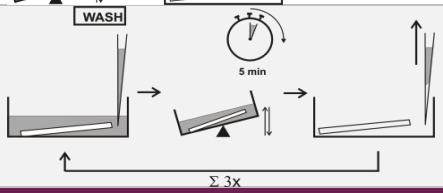
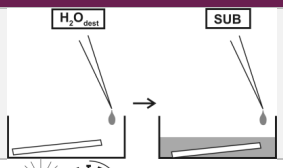
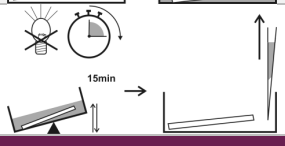
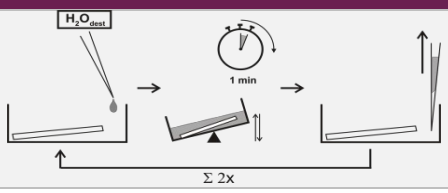
Pour la réalisation manuel du test, veuillez suivre la procédure suivante. Assurez-vous que les deux composants mentionnés dans le protocole sont ajoutés au plateau aux étapes 2, 6 et 9.

Ne laissez pas les bandelettes sécher pendant les étapes d'incubation. Ne touchez pas les bandelettes avec les doigts, utilisez lapince prévue à cet effet.

Retirez complètement les échantillons dilués après l'incubation des bandelettes afin d'éviter tout transfert.

Agitez continuellement les bandelettes pendant les étapes d'incubation.

Versez le tampon d'échantillon, le conjugué et le substrat avec le tampon de lavage sur l'un des côtés du plateau d'incubation. Ne laissez pas couler sur les bandelettes.

Étape	Description
1.	Assurez-vous que les préparatifs ont été effectués avant de commencer.
2.	 Placez les bandelettes dans le plateau d'incubation dans le bon sens (ligne de référence et code couleur vers le haut). Ne touchez les bandelettes qu'avec des pincettes. Ajoutez 1050 µl de tampon de lavage et 450 µl de tampon d'échantillon dans le plateau d'incubation contenant les bandelettes. Imbibez complètement les bandelettes avec la solution et incubez pendant 5 minutes en agitant.
Prélèvement	
3.	 Placez 15 µl d'échantillon de sérum/plasma dans le plateau d'incubation avec la bandelette et le tampon d'échantillon fournis.
4.	 Incuber pendant 30 minutes à 20-32 °C / 68-89,6 °F en agitant. Retirer ensuite complètement l'échantillon.
5.	 Laver 3 fois pendant 5 minutes avec 1,8 ml de solution de lavage à chaque fois tout en agitant. La solution de lavage est retirée après chaque étape de lavage.
Conjugué	
6.	 Ajouter 1050 µl de solution de lavage et 450 µl de conjugué dans chaque plateau d'incubation contenant les bandelettes.
7.	 Incuber pendant 30 minutes à 20-32 °C / 68-89,6 °F en agitant. Le conjugué est ensuite éliminé.
8.	 Laver 3 fois pendant 5 minutes avec 1,8 ml de solution de lavage à chaque fois tout en agitant. La solution de lavage est retirée après chaque étape de lavage.
Substrat	
9.	 Pipeter 1050 µl de dH_2O et 450 µl de substrat dans chaque puits.
10.	 Incuber pendant 15 minutes à 20-32 °C / 68-89,6 °F en agitant et protéger de la lumière intense. Retirer le substrat.
Arrêt	
11.	 Ajouter 2 ml de dH_2O et incuber pendant 1 minute en agitant. Retirer la dH_2O et répéter cette étape une fois.
12.	Placez les bandelettes dans le plateau d'incubation dans un Reader.

13.	Dans un délai de 20 minutes, les bandelettes humides peuvent être évaluées à l'aide d'un Reader.

8 Évaluation quantitative

8.1 Analyse

L'évaluation est effectuée à l'aide du logiciel intégré au système automatisé **HELIA® Automated Blot System ou un Lecteur**. Parallèlement, l'appareil vérifie chaque bandelette au regard des critères de validité.

8.1.1 Analyse manuelle à l'aide de BLOTrix Reader et du logiciel correspondant

L'analyse des bandelettes peut être effectuée manuellement à l'aide du logiciel BLOTrix system version 4.2 ou supérieure. Veuillez vous reporter au mode d'emploi de BLOTrix system pour obtenir des instructions détaillées.

Remarques importantes pour l'interprétation manuelle:

- L'interprétation visuelle des résultats du test n'est pas recommandée.
- Les résultats du test peuvent être considérés comme valides si les critères suivants sont remplis:
  - Les contrôles fonctionnels sont clairement visibles.
  - Les standards 1 à 3 sont visibles avec une intensité croissante.
  - Le contrôle négatif présente un signal moins intense que l'étalon 1

Si ces critères ne sont pas remplis, le test est considéré comme non valide et doit être répété.

L'analyse quantitative repose sur la comparaison des intensités de couleur des antigènes individuels avec celles des étalons. Le logiciel de BLOTrix system calcule les intensités des signaux et effectue l'évaluation en conséquence.

8.1.2 Analyse automatisée à l'aide de HELIA® Automated Blot System

Lorsque vous utilisez **HELIA® Automated Blot System**, l'évaluation s'effectue de manière entièrement automatique. Le logiciel intégré au système détermine le résultat en concentration arbitraire d'IgG (U/ml).

Principales caractéristiques de l'analyse **HELIA® Automated Blot System**:

- Le logiciel vérifie automatiquement la validité de chaque bandelette.
- Les intensités du signal (valeurs des barres) des lignes de test sont comparées à une courbe standard créée en reportant les valeurs de gris des étalons par rapport à leurs concentrations connues en U/ml
- L'évaluation est basée sur un modèle d'ajustement de courbe logistique à 4 paramètres (4PL).
- La concentration en U/ml obtenue pour chaque antigène est calculée et affichée.

8.2 Interprétation des résultats

8.2.1 Interprétation des résultats des marqueurs GRD

Résultats	Concentration en IgG en unités arbitraires (U/ml)
Négatif	< 12 U/ml
Équivoque	≥ 12 < 18 U/ml
Faible positif	≥ 18 < 30 U/ml
Positif	≥ 30 < 200 U/ml
Fort positif	≥ 200 U/ml

8.3 Remarques sur la validité et la qualité

Si les valeurs des contrôles ne répondent pas aux critères de validation prédéfinis, le test est considéré comme non valide et doit être répété. En cas de résultats équivoques ou limites, il est recommandé de répéter le test à l'aide d'un nouvel échantillon afin d'en garantir la fiabilité.

Vérifiez les sources d'erreur courantes:

- Dates d'expiration et stockage des réactifs.
- Étalonnage et fonctionnement des pipettes et des équipements.
- Précision des temps et des températures d'incubation.

Si des résultats inhabituels ou des problèmes de validation surviennent qui ne sont pas dus à une erreur de l'utilisateur, veuillez contacter le fabricant ou le fournisseur du kit.

Les laboratoires médicaux doivent mettre en œuvre des procédures de contrôle qualité internes à l'aide de sérums de contrôle appropriés et respecter les normes nationales applicables aux laboratoires.

9 Données techniques

Type d'échantillon:	sérum / plasma
Volume de l'échantillon:	15 µl d'échantillon
Temps d'incubation total:	117 minutes à une température de 20-32 °C / 68-89,6 °F
Plage de mesure:	0-300 U/ml
LoB:	Voir la rubrique 10.1
LoD:	Voir la rubrique 10.1
Stockage:	à 2-8 °C / 35,6-46,4 °F ; utiliser uniquement les flacons d'origine
Nombre de déterminations:	24 tests

10 Données de performance

10.1 Sensibilité analytique

La limite du blanc (anglais: Limit of Blank = LoB), qui correspond à la plus haute concentration possible détectée par le système de mesure, a été déterminée en utilisant 20 fois le réactif de blocage pour chaque antigène. La valeur suivante est déterminée pour tous les antigènes : 0,00 U/ml.

La limite de détection (anglais: Limit of Detection = LoD) correspond à la plus petite concentration détectée par le système de mesure. La LoD est fixée à 0,20 U/ml pour tous les antigènes.

10.2 Plage normale

Les sérums de donneurs sains ont été testés avec le kit ***AESKUBLOTS*® Gluten Related Disorders IgG** et les valeurs suivantes ont été obtenues:

Antigène	Nombre d'échantillons	Valeur moyenne [U/ml]	Médiane [U/ml]	Valeur minimale [U/ml]	Valeur maximale [U/ml]
Gliadine	120	0,85	0,02	0,00	15,85
DGP	120	0,01	0,00	0,00	0,44
tTG	120	0,36	0,01	0,00	12,85
tTG néo	120	0,01	0,00	0,00	1,10
TG3	120	0,07	0,00	0,00	7,63
mTG néo	120	0,04	0,00	0,00	1,58
mTG	120	0,00	0,00	0,00	0,02
Frazer's Fraction	120	0,20	0,01	0,00	9,53

Chaque laboratoire doit déterminer sa propre plage de valeurs normale.

10.3 Précision

La précision des résultats obtenus avec le kit de test ***AESKUBLOTS*® Gluten Related Disorders IgG** a été évaluée en déterminant la précision intratest et intertests, ainsi que la variation interlots d'après l'analyse de plusieurs échantillons de différentes concentrations.

Les valeurs moyennes de tous les échantillons ont été calculées et exprimées en U/ml. Pour les échantillons de la plage positive, le coefficient de variation (CV) est également indiqué en pourcentage. Pour les échantillons de la plage négative, l'indication nég. est utilisée pour confirmer les résultats négatifs. L'indication nég. a été utilisée, car les très petites valeurs (avec des échantillons négatifs), même les petites différences artificiellement augmentées, n'entraînent pas d'écarts significatifs.

Intratest

		Gliadine	DGP	tTG	tTG néo	TG3	mTG néo	mTG	Frazer's Fraction
Échantillon 1	Valeur moyenne [U/ml]	43,29	186,30	1,34	101,91	0,00	286,86	0,00	42,28
	CV [%]	18,30 %	6,35 %	Neg.	8,30 %	Neg.	7,32 %	Neg.	16,78 %
Échantillon 2	Valeur moyenne [U/ml]	10,12	40,80	0,12	43,71	0,00	149,87	0,00	6,55
	CV [%]	Neg.	16,49 %	Neg.	16,16 %	Neg.	10,27 %	Neg.	Neg.
Échantillon 3	Valeur moyenne [U/ml]	60,19	155,65	27,00	91,39	0,23	276,59	0,06	84,82
	CV [%]	11,06 %	13,90 %	19,35 %	7,51 %	Neg.	10,35 %	Neg.	14,14 %
Échantillon 4	Valeur moyenne [U/ml]	0.00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	CV [%]	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Échantillon 5	Valeur moyenne [U/ml]	0,00	0,00	0,23	0,00	0,01	0,01	199,42	0,00
	CV [%]	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	11,53 %	Neg.

Intertests

		Gliadine	DGP	tTG	tTG néo	TG3	mTG néo	mTG	Frazer's Fraction
Échantillon 1	Valeur moyenne [U/ml]	37,63	172,46	9,32	100,01	0,05	271,18	2,56	32,17
	CV [%]	20,48 %	9,78 %	Neg.	7,54 %	Neg.	7,54 %	Neg.	20,52 %
Échantillon 2	Valeur moyenne [U/ml]	7,25	33,90	0,33	38,64	0,04	131,62	0,03	3,74
	CV [%]	Neg.	21,44 %	Neg.	21,58 %	Neg.	14,82 %	Neg.	Neg.
Échantillon 3	Valeur moyenne [U/ml]	55,70	163,07	18,85	81,98	0,09	240,10	0,23	70,96
	CV [%]	15,22 %	10,53 %	23,33 %	12,21 %	Neg.	10,96 %	Neg.	20,66 %
Échantillon 4	Valeur moyenne [U/ml]	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
	CV [%]	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Échantillon 5	Valeur moyenne [U/ml]	0,01	0,06	2,96	0,00	0,02	0,09	194,04	0,19
	CV [%]	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	22,65 %	Neg.

Variation interlots

		Gliadine	DGP	tTG	tTG néo	TG3	mTG néo	mTG	Frazer's Fraction
Échantillon 1	Valeur moyenne [U/ml]	35,62	156,76	6,17	97,14	0,02	244,03	0,02	26,66
	CV [%]	17,78 %	12,98 %	Neg.	14,01 %	Neg.	12,50 %	Neg.	23,72 %
Échantillon 2	Valeur moyenne [U/ml]	4,91	34,82	0,54	45,52	0,03	145,14	0,01	4,02
	CV [%]	Neg.	20,89 %	Neg.	21,57 %	Neg.	15,50 %	Neg.	Neg.
Échantillon 3	Valeur moyenne [U/ml]	45,54	163,06	14,19	69,97	0,08	226,74	0,36	51,96
	CV [%]	23,38 %	9,60	20,47 %	14,49 %	Neg.	11,16 %	Neg.	25,14 %
Échantillon 4	Valeur moyenne [U/ml]	0,01	0,00	0,03	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
	CV [%]	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Échantillon 5	Valeur moyenne [U/ml]	0,77	0,72	0,89	0,96	1,12	0,42	167,84	0,02
	CV [%]	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	24,38 %	Neg.

10.4 Comparaison avec les concurrents

Étant donné l'absence de données cliniques concernant un régime sans gluten pour les échantillons mesurés, ce qui est déterminant pour la mise en évidence d'anticorps spécifiques, les échantillons ont été précaractérisés à l'aide d'un test de référence. Les échantillons prédéterminés comme positifs par le test de référence ont été considérés comme positifs et les échantillons prédéterminés comme négatifs ont été considérés comme négatifs. Les échantillons limites ont été considérés comme négatifs. Cette approche implique que le test de référence identifie correctement les échantillons, ce qui n'est pas nécessairement le cas. D'autres études doivent être réalisées à ce sujet.

10.4.1 DGP et tTG

Les antigènes DGP et tTG ont été comparés à un test LIA (line blot immunoassay) disponible dans le commerce (test de référence marqué CE) pour déterminer les anticorps spécifiques de la maladie cœliaque.

Maladie	Dosage DGP	Dosage tTG
Maladie cœliaque	12	6
Maladie de Crohn	31	31
Diabète de type 1	23	23
Rectocolite hémorragique	24	24
Gastro-entérite	23	23
Intolérance au lactose	17	17
Contrôles sains	60	60

DGP		Test de référence		
		Positif	Négatif	Total
AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG	Positif	9	0	9
	Négatif	3	178	181
	Total	12	178	190

DGP	[%]	95 % CI
Sensibilité	75,0	46,77 – 91,11
Spécificité	100,0	97,89 - 100
Concordance totale	98,4	95,5 – 99,5

Dans l'ensemble analysé, qui a été précaractérisé à l'aide d'un test de référence, une sensibilité de 75,0 % a été déterminée avec une spécificité de 100 % par rapport au système de référence. Les valeurs obtenues sont fondées sur l'hypothèse que le test de référence classe correctement tous les échantillons. L'antigène DGP est très probablement constitué de deux variants peptidiques différents.

tTG		Test de référence		
		Positif	Négatif	Total
AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG	Positif	6	1	7
	Négatif	0	177	177
	Total	6	178	184

tTG	[%]	95 % CI
Sensibilité	100,0	60,97 - 100
Spécificité	99,4	96,89 - 99,97
Concordance totale	99,5	97,0 - 99,9

Dans l'ensemble analysé, qui a été précaractérisé à l'aide d'un test de référence, une sensibilité de 100 % a été déterminée avec une spécificité de 99,4 % par rapport au système de référence. Les valeurs obtenues sont fondées sur l'hypothèse que le test de référence classe correctement tous les échantillons.

10.4.2 Gliadine et tTG néo

Les antigènes gliadine et tTG néo ont été comparés à un test ELISA (produits d'Aesku.Diagnostics GmbH & Co.KG marqués CE) pour déterminer les anticorps dirigés contre la gliadine et la tTG néo.

Disease	measured Gliadine	measured tTG néo
Maladie cœliaque	40	27
Maladie de Crohn	31	31
Diabète de type 1	23	23
Rectocolite hémorragique	24	24
Gastro-entérite	23	23
Intolérance au lactose	17	17
Contrôles sains	100	100

Gliadine		Test de référence		
		Positif	Négatif	Total
AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG	Positif	29	2	31
	Négatif	25	202	227
	Total	54	204	258

Gliadine	[%]	95 % CI
Sensibilité	53,7	40,61 - 66,31
Spécificité	99,0	96,50 - 99,83
Concordance totale	89,5	85,2 - 92,7

Dans l'ensemble analysé, une sensibilité de 53,7 % a été déterminée avec une spécificité de 99 % par rapport au système de référence. Les valeurs déterminées sont fondées sur l'hypothèse que le test de référence classe correctement tous les échantillons.

tTG néo		Test de référence		
		Positif	Négatif	Total
AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG	Positif	21	0	21
	Négatif	8	216	224
	Total	29	216	245

tTG néo	[%]	95 % CI
Sensibilité	72,4	54,3 - 85,3
Spécificité	100,0	98,3 - 100,0
Concordance totale	96,7	93,7 - 98,3

Dans l'ensemble analysé, une sensibilité de 72,4 % a été déterminée avec une spécificité de 100,0 % par rapport au système de référence. Les valeurs obtenues sont fondées sur l'hypothèse que le test de référence classe correctement tous les échantillons.

10.4.3 mTG néo et mTG

Il n'existe actuellement sur le marché aucun comparateur pour les antigènes mTG néo et mTG. Il a néanmoins été possible d'effectuer un test comparatif avec les kits ELISA RUO (Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG) pour déterminer les anticorps dirigés contre la mTG néo et la mTG.

Disease	measured mTG néo	measured mTG
Maladie cœliaque	53	102
Maladie de Crohn	31	31
Diabète de type 1	23	23
Rectocolite hémorragique	24	24
Gastro-entérite	23	23
Intolérance au lactose	17	17
Contrôles sains	100	100

mTG néo		Test de référence		
		Positif	Négatif	Total
AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG	Positif	47	0	47
	Négatif	37	187	223
	Total	84	187	271

mTG néo	[%]	95 % CI
Sensibilité	56,0	45,3 - 66,1
Spécificité	100,0	97,9 - 100,0
Concordance totale	86,3	81,7 - 89,9

Dans l'ensemble analysé, une sensibilité de 56,0 % a été déterminée avec une spécificité de 100 % par rapport au système de référence. Les valeurs déterminées sont fondées sur l'hypothèse que le test de référence classe correctement tous les échantillons.

mTG		Test de référence		
		Positif	Négatif	Total
AESKUBLOTS® Gluten Related Disorders IgG	Positif	0	0	0
	Négatif	0	320	320
	Total	0	320	320

mTG	[%]	95 % CI
Sensibilité	-	-
Spécificité	100,0	98,8 - 100,0
Concordance totale	100,0	98,8 - 100,0

Des études antérieures ont montré que les anticorps anti-mTG sont très rares. Cela a pu être confirmé pour le test ***AESKUBLOTS*® Gluten Related Disorders IgG**. Une spécificité de 100 % a été déterminée par rapport au système de référence. Les valeurs déterminées sont fondées sur l'hypothèse que le test de référence classe correctement tous les échantillons.

10.5 Linéarité

Pour certains sérums, une relation linéaire entre la dilution et la concentration d'anticorps a pu être déterminée dans ce test. Tous les échantillons répertoriés présentent un $R^2 > 0,95$. Cependant, en raison de l'hétérogénéité des anticorps humains, il ne peut être exclu que des sérums individuels présentent un comportement non linéaire.

Antigen	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4
	R^2	R^2	R^2	R^2
Gliadine	0,956	0,979	0,987	0,954
DGP	0,978	0,980	0,971	-
tTG	0,987	0,977	0,988	-
tTG néo	0,965	0,992	0,967	0,964
TG3	-	-	-	-
mTG néo	0,973	0,980	0,994	0,970
mTG	0,961	0,961	0,962	-
Frazer's Fraction	0,976	0,958	0,979	-

10.6 Étalonnage

Le système de mesure quantitative est étalonné en unités provisoires en raison de l'absence d'étalon de référence international. Les résultats sont exprimés en U/ml.

11 Mise au rebut

Respectez les obligations légales en vigueur !

12 Note destinée à l'utilisateur (Union européenne)

Tout incident grave survenant dans le cadre de l'utilisation du dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

13 Bibliographie

Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F., . . . Bardella, N. T. (21. Juni 2015). Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. World Journal of Gastroenterology, S. 7110-7119.

Lerner, A., Aminov, R., & Matthias, T. (24. 01 2017). Transglutaminases in Dysbiosis As Potential Environmental Drivers of Autoimmunity. frontiers in Microbiology. 8:66, S. 1-7.

Lerner, A., Jeremias, P., Neidhöfer, S., & Matthias, T. (2015). Antibodies against neo-epitope tTg complexed to gliadin are different and more reliable then anti-tTg for the diagnosis of pediatric celiac disease. Journal of Immunological Methods, S. 1-6.

Lytton, S.D. et al. (2013). Neo-pitope tissue transglutaminase autoantibodies as a biomarker of the gluten sensitive skin disease – dermatitis herpetiformis. Clinica Chimica Acta, Volume 415, 16. January 2013, Pages 346-349

Mahadev, S.; Green, P.H.R. (08.08.2011). Review Celiac Disease: A challenge for all physicians. Gastroenterology & Hepatology (7), S. 554-556

Matthias, T., Jeremias, P., Neidhöfer, S., & Lerner, A. (15. September 2016). The industrial food additive, microbial transglutaminase, mimics tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. Autoimmunity Reviews (15), S. 1111-1119.

Nejad, M. R., Karkhane, M., Marzban, A., Mojarad, E. N., & Rostami, K. (9. März 2012). Gluten related disorders. Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench, S. 1-7.

Schuppan, D., & Zimmer, K.-P. (06. 12 2013). Diagnostik und Therapie der Zöliakie. Deutsches Ärzteblatt, S. 835 - 846.

Singh, P., Arora, A., Strand, T.A., Leffler, D.A., Catassi, C., Green, P.H., Kelly, C.P., Ahuja, V., Makharia, G.K. (2018) Global prevalence of celiac disease: systemic review and meta-analysis. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2018; 16:823-836

Littérature générale :

Peter JB, Shoenfeld Y (1996). Autoantibodies. Elsevier Sciences B.V., Amsterdam.

Lothar Thomas: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik., 8. Auflage, TH Books

CLSI Guideline GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests

14 Symboles réglementaires

IVD	¨ Diagnosi in vitro	¨ For in vitro diagnostic use
	¨ Pour diagnostic in vitro	¨ Para uso diagnóstico in vitro
	¨ In Vitro Diagnostikum	¨ In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	¨ Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	¨ Numero d'ordine	¨ Cataloge number
	¨ Référence Catalogue	¨ Numéro de catálogo
	¨ Bestellnummer	¨ Αριθμός παραγγελίας
	¨ Número de catálogo	
LOT	¨ Descrizione lotto	¨ Lot
	¨ Lot	¨ Lote
	¨ Chargen Bezeichnung	¨ Χαρακτηρισμός παρτίδας
	¨ Lote	
UDI	¨ Identificatore univoco del dispositivo	¨ Unique Device Identifier
	¨ Identifiant unique de l'appareil	¨ Identificador único del dispositivo
	¨ eindeutige Produktidentifizierung	¨ Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	¨ Identificador único do dispositivo	
CE	¨ Conformità europea	¨ EC Declaration of Conformity
	¨ Déclaration CE de Conformité	¨ Declaración CE de Conformidad
	¨ Europäische Konformität	¨ Ευρωπαϊκή συμφωνία
	¨ Déclaracão CE de Conformidade	
Σ 24	¨ 24 determinazioni	¨ 24 tests
	¨ 24 tests	¨ 24 pruebas
	¨ 24 Bestimmungen	¨ 24 προσδιορισμοί
	¨ 24 Testes	
	¨ Rispettare le istruzioni per l'uso	¨ See instructions for use
	¨ Voir les instructions d'utilisation	¨ Ver las instrucciones de uso
	¨ Gebrauchsanweisung beachten	¨ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	¨ Ver as instrucões de uso	
	¨ Da utilizzarsi entro	¨ Use by
	¨ Utilise avant le	¨ Utilizar antes de
	¨ Verwendbar bis	¨ Χρήση μέχρι
	¨ Utilizar antes de	
+2°C +8°C	¨ Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	¨ Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	¨ Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	¨ Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	¨ Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	¨ Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	¨ Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	¨ Prodotto da	¨ Manufactured by
	¨ Fabriqué par	¨ Fabricado por
	¨ Hergestellt von	¨ Κατασκευάζεται από
	¨ Fabricado por	
STRIP	¨ Strip di nitrocelluslosa rivestita	¨ Coated nitrocellulose strip
	¨ Strip de nitrocellulose couché	¨ Tira de nitrocelulosa recubierta
	¨ Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgebrachten Antigenen	¨ Επίστρωση λωρίδα νιτροκυτταρίνης
	¨ Tira de nitrocelulose revestido	
WASH 20x	¨ Tampone di lavaggio	¨ Wash buffer
	¨ Tampon de Lavage	¨ Solución de lavado
	¨ Waschpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	¨ Solucão de lavagem	
BLOCK-REAG	¨ Reagente bloccante	¨ Blocking Reagent
	¨ réactif de blocage	¨ Reactivo bloqueante
	¨ Blockier-Reagenz	¨ Αντιδραστήριο αποκλεισμού
	¨ Bloqueio de reagente	
RCNS 10ml	¨ Ricostituire con 10 mL	¨ Reconstitute with 10 mL
	¨ reconstituer avec 10 mL	¨ reconstituir con 10 mL
	¨ rekonstituiren mit 10 mL	¨ Ανασύσταση με 10 mL
	¨ reconstituir com 10 mL	
SB	¨ Tampone campione	¨ Sample buffer
	¨ Tampon Echantillons	¨ Tampón Muestras
	¨ Probenpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	¨ Diluente de amostra	
CONJ	¨ Coniugato	¨ Conjugate
	¨ Conjugé	¨ Conjugado
	¨ Konjugat	¨ Σύζευγμα
	¨ Conjugado	
SUB	¨ Tampone substrato	¨ Substrate buffer
	¨ Substrat	¨ Tampón sustrato
	¨ Substratpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	¨ Substrato	