

AESKUBLOTS[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

**INSTRUCTION
MANUAL**

AESKUBLOTS[®] Gastro Pro
Ref 4005



Product Ref.	4005
Product Desc.	Gastro Pro
Manual Rev. No.	007 : 2016-11-02

Mode d'emploi

Sommaire

1	Usage prévu	1
2	Application clinique et principe du test	1
3	Composants du kit	2
4	Stockage et durée de conservation	2
5	Indications et mesures de précaution.....	3
6	Prélèvement des échantillons, préparation et stockage	4
7	Mode opératoire.....	4
8	Analyse qualitative	7
9	Technical Data.....	7
10	Caractéristiques.....	8
11	Bibliographie	8



1 Usage prévu

Le test **AESKUBLOTS® Gastro Pro** est une méthode immunoenzymatique sur membrane pour la mise en évidence qualitative d'anticorps des sous-classes d'IgA et d'IgG anti-gliadine, anti-tTg neo-épitope, anti-mannane (ASCA), anti-cellule pariétale et anti-facteur intrinsèque dans le sérum. Les antigènes sont déposés sur les membranes de nitrocellulose à des endroits définis de manière à former des lignes.

Le test constitue une aide au diagnostic de la maladie cœliaque, de l'anémie pernicieuse et de la maladie de Crohn.

2 Application clinique et principe du test

Chaque section du tractus gastro-intestinal peut être atteint par les maladies gastro-intestinales auto-immunes. Les maladies ne sont souvent diagnostiquées que plusieurs années après la première apparition des symptômes et suivent souvent une évolution grave. Les patients atteints de la maladie cœliaque présentent souvent une déficience en IgA. Afin d'éviter des résultats faussement négatifs, ce test permet de déceler les anticorps IgA et IgG.

Anticorps dirigés contre :

- la gliadine, typiques de la maladie cœliaque. Les anticorps de la sous-classe IgA sont pour l'essentiel spécifiques de la maladie cœliaque. Les anticorps du type IgG apparaissent également chez 40 à 50 % des patients atteints de la maladie de Crohn et 10 à 20 % des patients souffrant de rectocolite hémorragique.
- la tTg « néo-épitope » ou néo-tTg, transglutaminase tissulaire catalysant la réticulation des peptides spécifiques de la gliadine, constitue un marqueur fiable de la maladie cœliaque et de la dermatite herpétiforme (maladie de Duhring-Brocq). En raison de leur similitude structurelle avec des épitopes physiologiques, les anticorps anti-tTg néo-épitope présentent une sensibilité et une spécificité élevées comparativement aux anticorps anti-tTg (sensibilité de 98 à 100 % ; spécificité de 93 à 96 %).
- le mannane (ASCA), qui présentent une spécificité de 97 % pour la maladie de Crohn. Ils jouent un rôle déterminant dans le diagnostic différentiel de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique. 75 % des patients atteints de la maladie de Crohn présentent, contrairement aux patients souffrant de rectocolite hémorragique, présentent une augmentation du taux d'anticorps.
- les cellules pariétales de l'estomac, qui peuvent être décelées chez 80 à 90 % des patients atteints d'une anémie pernicieuse à l'aide d'un test d'immunofluorescence indirecte, mais apparaissent également chez 2 à 5 % des sujets sains. Ils se trouvent en outre chez les patients atteints de maladie auto-immunes endocriniennes et de gastrite chronique atrophique de type A.
- le facteur intrinsèque, qui présentent une sensibilité de 50-70 % dans le cas de l'anémie pernicieuse et une spécificité de 100 % dans une population de donneurs de sangs sains. Ces anticorps sont même présents chez les patients atteints de maladies de la thyroïde auto-immunes et de gastrite chronique atrophique de type A.

Principe du test

Les antigènes doivent être déposés en ligne sur la bandelette de membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée de manière à éviter les liaisons non spécifiques. Les bandelettes de membrane sur lesquelles sont déposés les antigènes spécifiques sont incubées dans les boîtes d'incubation avec des échantillons de sérum dilués à 1:101. S'ils sont présents, les anticorps spécifiques du sérum du patient se lient alors à l'antigène situé sur la membrane. Les composants non liés du sérum sont retirés en les lavant au cours des étapes de lavage suivantes. Les anticorps dirigés contre l'immunoglobuline humaine, marqués à la peroxydase du raifort (conjugué), sont ensuite ajoutés. Pendant une période d'incubation, ils se lient au complexe antigène-anticorps précédemment formé, l'immunoglobuline non liée est retirée au cours des étapes de lavage suivantes. La mise en évidence des anticorps liés s'effectue à l'aide d'une réaction enzymatique colorée au cours de laquelle le substrat incolore est converti en précipité (bleu). La réaction est stoppée au moyen de l'eau distillée.

3 Composants du kit

Reconstituer avant utilisation				
Composant du kit	Quantité	Couleur du bouchon	Couleur de la solution	Description / Contenu
Réactif de blocage	3 x pour 10 ml de concentré	blanc	s.o.	Lait écrémé en poudre pour la préparation de 10 ml de tampon d'échantillon
Tampon de lavage 20x	1 x 50 ml	blanc	incolore	concentré 20 fois pour 1 L de tampon Tris, pH 6,9 ± 0,2
Prêt à l'emploi				
Composant du kit	Quantité	Couleur du bouchon	Couleur de la solution	Description / Contenu
Conjugué IgG	1 x 10 ml	bleu	incolore	Anti-immunoglobuline humaine G (IgG) marqué à la peroxydase du raifort
Conjugué IgA	1 x 10 ml	rouge	incolore	Anti-immunoglobuline humaine A (IgA) marqué à la peroxydase du raifort
Substrat	1 x 10 ml	noir	incolore	TMB/ H2O2 stabilisé
Bandelettes de test	24 bandelettes	Code couleur noir	s.o.	Antigènes déposés : voir Usage prévu
Pincette, modèle d'interprétation transparent, feuille d'évaluation, étiquette adhésive double face (noire) pour la fixation des bandelettes	1 de chaque	s.o.	s.o.	s.o.
boîte d'incubation,	3	s.o.	s.o.	s.o.
Étiquettes pour tampon d'échantillon	3	s.o.	s.o.	s.o.
Matériel requis non fourni avec le kit :				
Agitateur-balance, éprouvette graduée de 1 000 ml, pipette ou éprouvette graduée pour volumes de 10 ml, micropipettes (10, 1 000 µl), papier absorbant ou papier filtre. Nos tests ont été développés pour une utilisation avec de l'eau purifiée (purified water) conforme à la définition de la Pharmacopée des Etats-Unis (USP 26 - NF 21) et de la Pharmacopée européenne (Eur. Ph. 4 ^{te} Ed.).				

4 Stockage et durée de conservation

Les réactifs de ce kit et les bandelettes de la membrane doivent être stockés à 2-8°C/35-46°F dans leur flacon d'origine. Les solutions diluées peuvent être conservées 6 semaines à 2-8°C/35-46°F. Les dates de péremption indiquées sur l'emballage et les étiquettes de chacun des composants doivent être observées. Les composants du kit dont la date de péremption est dépassée ne doivent plus être utilisés ! Une forte exposition à la lumière de la solution de TMB du substrat doit être évitée.

5 Indications et mesures de précaution

5.1 Risque sanitaire

L'usage de ce produit doit se limiter exclusivement au DIAGNOSTIC IN VITRO. Seul un personnel spécialement formé et ayant bénéficié d'un enseignement sur l'utilisation de diagnostics in vitro peuvent procéder à son application. Les réactifs contenus dans ce produit ne sont ni toxiques ni dangereux pour la santé s'ils sont utilisés en bonne et due forme. Cependant, pour garantir une sécurité maximale de l'utilisateur, les points suivants sont à observer.

Recommandations et mesures de précaution

Etant donné que certains composants du kit contiennent des réactifs potentiellement dangereux, ceux-ci peuvent provoquer une irritation oculaire et cutanée.

Le substrat contient du Kathon (1 % vol.), un conservateur. Ne pas avaler le réactif et éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

Ne pas manger, boire ou fumer pendant l'exécution de tâches faisant intervenir les éléments du kit. Ne pas pipeter avec la bouche, porter des gants jetables.

Les sérums des patients sont à classer dans la catégorie des substances potentiellement infectieuses et à manipuler conformément à la situation juridique nationale.

5.2 Indications générales

Afin de différencier les tests **AESKUBLOTS®** disponibles, un code couleur se situe au-dessus de la ligne de contrôle de la bandelette:

Code couleur	AESKUBLOTS®
jaune	ANA-12 Pro
orange	ANA-17 Pro
bleu	Myositis Pro
brun	Liver Pro
mauve	Vasculitis Pro
noir	Gastro Pro
vert	Borrelia-G et Borrelia-M

Si des informations produit sont incorrectes, y compris celles des étiquettes, merci de contacter le fabricant ou le fournisseur du kit.

Le réactif de blocage et le tampon de lavage peuvent être échangés entre les lots et les emballages des tests. Tous les autres composants sont spécifiques et ne doivent pas être échangés. Ne pas échanger les composants entre le test de diagnostic pour l'auto-immunité et celui pour la borréliose.

Aucun récipient en polystyrène ne doit être utilisé pour la manipulation du conjugué.

Tous les composants du kit doivent être à température ambiante (20-32°C/68-89,6°F) et bien mélangés. Le protocole prescrit pour le mode opératoire doit être impérativement observé afin d'obtenir des résultats optimaux.

N'exposez jamais séparément les composants du kit à des températures supérieures à 37°C/ 98,6°F.

Toujours pipeter la solution du substrat avec des pointes de pipettes neuves afin d'éviter toute contamination. Protéger la solution du substrat de la lumière. Ne jamais pipeter la solution du conjugué avec des pointes de pipettes contaminées par d'autres réactifs.

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

Même les échantillons de personnes apparemment saines peuvent présenter des autoanticorps.

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

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

6 Prélèvement des échantillons, préparation et stockage

Il est recommandé d'utiliser des échantillons frais de sérum. La prise de sang doit être effectuée en conformité avec la situation juridique nationale. Ne pas utiliser d'échantillons de sérum atteints par un ictère, une lipémie, une hémolyse ou contaminés par des bactéries. En cas d'échantillons troubles, centrifuger légèrement les particules (< 1000 x g). Collecter les échantillons de sang dans des tubes propres, secs et vides.

Une fois prélevés, les échantillons de sérum doivent être utilisés dans les 8 h qui suivent ou conservés fermés pendant 48 h à 2-8°C/35-46°F. Si un stockage plus long est envisagé, les échantillons doivent être congelés à -20°C/-4°F. Des congélations et décongélations à répétition doivent être évitées. Ne pas utiliser d'échantillons de sérum activés par la chaleur (56°C/132,8°F).

7 Mode opératoire

7.1 Préparation

Dilution de réactifs concentrés :

Dissoudre éventuellement les cristaux de sel du concentré de tampon de lavage. Les cristaux peuvent être à nouveau dilués en chauffant légèrement, mais la température doit suffire.

Diluer à 1:20 le tampon de lavage concentré avec de l'eau distillée (50 ml plus 950 ml p.ex.).

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

7.2 Etapes

Important :

Suivez exactement ce protocole. Assurez-vous que les deux éléments mentionnés dans le protocole sont ajoutés à la barre dans les étapes 2, 6, 9.

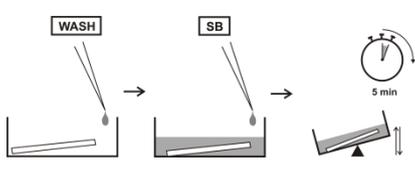
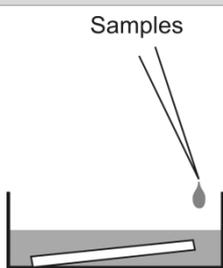
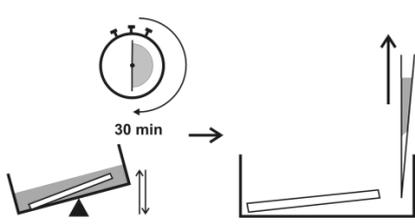
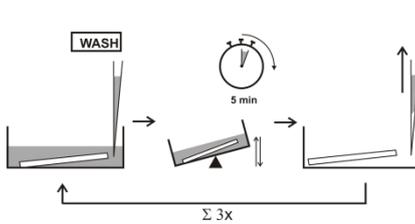
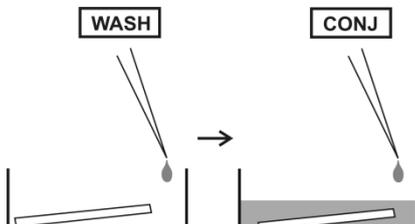
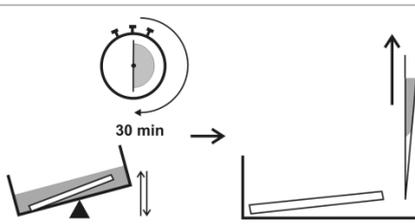
Ne pas laisser sécher les bandelettes de test entre les étapes d'incubation.

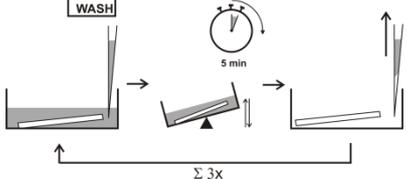
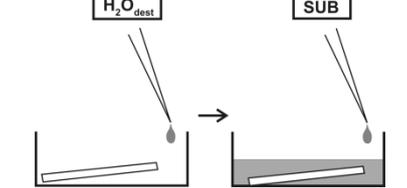
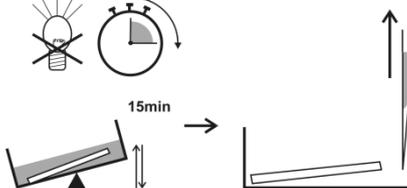
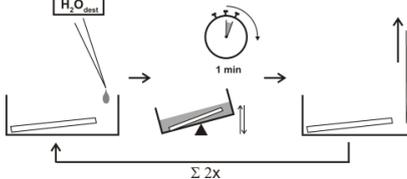
Ne pas toucher les bandelettes de test avec les mains, utiliser une pincette.

Retirer complètement les échantillons de sérum dilués après l'incubation pour éviter qu'ils ne se déplacent.

Agiter en permanence les bandelettes de test au moyen de l'agitateur-balance pendant l'incubation.

Ajouter le tampon d'échantillon, le conjugué et le substrat avec le tampon de lavage d'un côté de la boîte d'incubation. Ne pas laisser couler par-dessus la bandelette.

Etape	Description
1.	Assurez-vous que les préparatifs décrits au chapitre 7.1 ont été effectués avant le début du test.
2.	 <p>Placer la bandelette dans le bon sens (ligne de contrôle et code couleur vers le haut) dans la boîte d'incubation. Ne toucher la bandelette qu'avec une pincette. Ajouter 700 µl de tampon de lavage et 300 µl de tampon d'échantillon dans la boîte d'incubation avec la bandelette. Recouvrir complètement la bandelette avec la solution et laisser incuber 5 minutes sous agitation.</p>
ECHANTILLON	
3.	 <p>Pipetez à chaque fois 10 µl d'échantillon de sérum dans la boîte d'incubation avec la bandelette prévue et le tampon d'échantillon.</p>
4.	 <p>Incuber 30 minutes à 20-32°C/68-89,6°F sous agitation. Puis retirer complètement l'échantillon.</p>
5.	 <p>Laver 3 fois pendant 5 minutes avec à chaque fois 1,5 ml de solution de lavage en agitant avec précaution. Retirer la solution de lavage après chaque étape de lavage.</p>
CONJUGUE	
6.	 <p>Ajouter 700 µl de solution de lavage et 300 µl de conjugué dans chaque boîte d'incubation contenant une bandelette.</p>
7.	 <p>Incuber 30 minutes à 20-32°C/68-89,6°F sous agitation. Retirer le conjugué.</p>

8.		<p>Laver 3 fois pendant 5 minutes avec à chaque fois 1,5 ml de solution de lavage en agitant avec précaution. Retirer la solution de lavage après chaque étape de lavage.</p>
SUBSTRAT		
9.		<p>Pipeter 700 µl de dH₂O et 300 µl de substrat dans chaque cavité.</p>
10.		<p>Incuber 15 minutes à 20-32°C/68-89,6°F sous agitation, protéger de toute exposition lumineuse intense. Retirer le substrat.</p>
STOP		
11.		<p>Ajouter 2 ml de dH₂O. Incuber 1 minute sous agitation. Retirer le dH₂O. Répétez l'étape</p>
12.	Retirer la bandelette de la boîte d'incubation et sécher entre deux papiers filtre.	
13.	Analyser les bandelettes incubées dans les 24 heures.	

8 Analyse qualitative

8.1 Analyse manuelle

Le test peut être considéré comme valide lorsque

- la bande témoin de fonctionnement apparaît,
- la bande de détection est visible,
- l'intensité chromatique de la bande de détection est inférieure à celle de la bande témoin de fonctionnement.

Fixer la bandelette sèche à la feuille d'évaluation en faisant coïncider la ligne de référence. Poser le modèle d'interprétation sur la bandelette en faisant coïncider la ligne de référence. Interpréter les résultats uniquement à l'aide de la bande de détection située sur la bandelette du test considéré.

Une copie couleur de toutes les bandes pouvant être mises en évidence par le test est adjointe à chaque emballage de test.

L'interprétation s'effectue en comparant l'intensité chromatique de la bande apparue à celle de la bande de détection. Si l'intensité chromatique est comparable à celle de la bande de détection, le résultat du test doit être considéré comme douteux. En cas de coloration intense, le test est positif et en cas de faible coloration, le test est négatif.

Les résultats du test peuvent être notés sur la feuille d'évaluation.

Si les valeurs des bandes de contrôle ne remplissent pas les critères de validation, le test est invalide et doit être réexécuté. En cas de résultats douteux, la répétition du test avec un nouvel échantillon est également recommandée.

Les sources d'erreur suivantes doivent être contrôlées : données de conservation des réactifs, conditions de stockage, pipettes, appareils utilisés et conditions d'incubation.

Si les échantillons testés présentent des valeurs inhabituelles ou déviantes ou si les critères de validation ne sont pas remplis pour des motifs ne relevant pas de la responsabilité de l'utilisateur, merci de contacter le fabricant ou le fournisseur du kit.

Les laboratoires d'analyse médicale doivent effectuer des contrôles qualité à l'aide de contrôles qui leur sont propres et/ou de sérums conformes à la réglementation nationale.

9 Technical Data

Echantillon :	sérum
Volume d'échantillon :	10 µl de sérum
Temps d'incubation total :	112 minutes à 20-32°C/68-89.6°F
Stockage :	à 2-8°C/35-46°F dans les flacons d'origine.
Nombre de tests :	24 tests

10 Caractéristiques

10.1 Sensibilité et Spécificité relative

Pour déterminer la conformité positive (sensibilité relative), 30 sérums de patients avec des anticorps positifs à IIF ou Elisa ont été analysés avec **AESKUBLOTS® Gastro Pro**. La conformité négative (spécificité relative) a été déterminée en utilisant 100 échantillons de sérum collectés chez des donneurs de sang apparemment sains.

	Conformité positive (sensibilité relative)	Conformité négative (spécificité relative)
anti-gliadine	100 %	100 %
anti-neo-tTg	100 %	100 %
anti-mannane (ASCA),	100 %	100 %
anti-cellule pariétale	100 %	100 %
anti-facteur intrinsèque	100 %	100 %

11 Bibliographie

Carmel R (1992). Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. *Clin Exp Immunol*. 89(1):74-77.

Lerner A (2014). Serological Diagnosis of Celiac Disease –Moving Beyond the Tip of the Iceberg. *International Journal of Celiac Disease*. 2(2): 64-66.

Catassi C, Räscht I-M, Fabiani E, Rossini M, Coppa GV, Giorgi PL, Bordicchia F, Candela F (1994). Celiac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *The Lancet*. 343:200–203.

Holtmeier W, Caspary WF (1998). Antikörperdiagnostik bei Sprue/Zöliakie. *Z. Gastroenterol*. 36: 587–597.

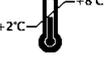
Mäki M, Collin P (1997). Coeliac disease. *Lancet*. 349: 1755–1759.

Oh R, Brown DL (2003). Vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician*. 67: 979–986.

Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C (2002). Structural basis for gluten intolerance in Celiac Sprue. *Science* 297:2275–2279.

Toh Ban-Hock, Alderuccio, F. (2004). Pernicious anaemia. Autoimmunity. 37: 357–361.

Toh Ban-Hock, van Driel Ian R. (1997). Pernicious anaemia. *NEJM*. 337:1441–1448.

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	" Catalogue number
	" Référence Catalogue	" Numéro de catálogo
	" Bestellnummer	" Αριθμός παραγγελίας
	" Número de catálogo	
LOT	" Descrizione lotto	" Lot
	" Lot	" Lote
	" Chargen Bezeichnung	" Χαρακτηρισμός παρτίδας
	" Lote	
CE	" Conformità europea	" EC Declaration of Conformity
	" Déclaration CE de Conformité	" Declaración CE de Conformidad
	" Europäische Konformität	" Ευρωπαϊκή συμφωνία
	" Declaração CE de Conformidade	
	" 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 instruções de uso	
	" Da utilizzarsi entro	" Use by
	" Utilise avant le	" Utilizar antes de
	" Verwendbar bis	" Χρήση μέχρι
	" Utilizar antes de	
	" Conservare a 2-8°C	" Store at 2-8°C (35-46°F)
	" Conserver à 2-8°C	" Conservar a 2-8°C
	" Lagerung bei 2-8°C	" Φυλάσσεται στους 2-8°C
	" Conservar entre 2-8°C	
	" Prodotto da	" Manufactured by
	" Fabriqué par	" Fabricado por
	" Hergestellt von	" Κατασκευάζεται από
	" Fabricado por	
STRIP	" Strip di nitrocellulosa rivestita	" Coated nitrocellulose strip
	" Strip de nitrocellulose couché	" Tira de nitrocellulosa recubierta
	" Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgebracht 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
	" Solução 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
	" rekonstituieren 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	