



## Test ELISA Anticorps anti-Gliadine (AGA)

IVD

### ENCART DU PRODUIT

REF 37979 Test Anti-Gliadine ELISA 96 Tests

Menarini™ Anticorps anti-Gliadine est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection des anticorps anti-gliadine IgA et IgG dans le sérum humain.

### GENERALITES

Les entéropathies de sensibilité au gluten (GSE), telles que la maladie coeliaque (CD) et la dermatite herpétiforme (DH), sont un désordre gastro-intestinal hétérogène de la sensibilité par rapport au gluten cliniquement courant qui peut se manifester par des symptômes non classiques ou minimes<sup>1</sup>. Il y a une composante génétique associée au GSE, ce qui est illustré par le fait que 5 à 10% des parents de premier degré souffrent de CD symptomatique ou asymptomatique. Les enfants de petite taille, les patients diabétiques sous insuline ou d'autres désordres auto-immunitaires semblent indiquer une plus grande probabilité de développer le GSE. Une suppression totale du gluten du régime alimentaire est recommandé pour contrôler l'activité de la maladie et diagnostiquer plus tôt de tels patients afin d'augmenter leur pronostics<sup>2</sup>.

Il a été recommandé que des patients suspectés de GSE se soumettent à un test sérologique tel qu'une méthode de screening et qu'ils contrôlent le bon déroulement de leur régime. La European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) recommande la réalisation de plusieurs tests sérologiques pour réduire le nombre de biopsies intestinales nécessaires pour rendre un diagnostic correct<sup>3</sup>. Ces derniers incluent les tests pour la recherche des anticorps anti-gliadine (AGA), anti-réticuline (ARA) et anti-endomysiaux (EMA). Parmi ceux-ci, les AGA ont été le plus étudiés<sup>4-16</sup>. En utilisant la méthode ELISA, les AGA de la classe des IgA et ceux de la classe des IgG peuvent être détectés dans les sérums des patients souffrant de GSE. Parmi ceux-ci, les AGA de la classe des IgG semblent être des indicateurs plus sensibles mais moins spécifiques du GSE que les AGA de la classe IgA. Les AGA de la classe des IgA sont, d'un autre côté, moins sensibles mais plus spécifiques pour le GSE.

### PRINCIPES DE LA METHODE

Les antigènes anti-gliadine sont fixés sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont immédiatement bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque AGA présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique d'immunoglobulines humaines est alors ajouté dans chaque puit. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités ELISA (EU/ml).

### INFORMATION PRODUIT

#### Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser. Lors d'un stockage entre 2 et 8 °C, le tampon de lavage reste stable jusqu'à la date d'échéance du kit. Reconstituer le tampon de lavage pour 1 litre avec de l'eau déionisée ou distillée. Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.



## Précautions

Pour utilisation *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>21</sup>.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

**La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice.** Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Respectez les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

## Matériel fourni

Menarini™ Test Anti-Gliadine ELISA **REF** 37979

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>AGA</b>	<i>Micro-lamelle</i> avec micropuits individuels, revêtus d'antigène anti-gliadine.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>AGA</b> *	<i>Etalon (couvercle vert)</i> , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-gliadine.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>AGA</b> *	<i>Contrôle positif (couvercle rouge)</i> , prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-AGA.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> - *	<i>Contrôle négatif (couvercle blanc)</i> , prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgA/IgG - CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<i>Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines</i> . Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant pour sérum</b> prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat enzymatique</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampon de lavage</b> en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.






\* Contient < 0.1%  $\text{NaN}_3$

## Symboles utilisés sur les étiquettes:

**LOT** Numéro de lot

**REF** Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

#### Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Timer
- Papier absorbant
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongelations successives des sérums.

#### METHODE

##### Préparation du test

Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.

- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité.**
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.

#### MODE OPERATOIRE

##### Exécution du test

1. **Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20-26°C) avant de réaliser le test.**
2. Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. C'est une bonne pratique



de vérifier les échantillons en double.

3. Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
4. **Prendre les micropuits nécessaires, remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient scellé et le replacer au réfrigérateur. Placer les micropuits en sécurité sur le support fourni.**

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

5. Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.  
**Note** : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce puit ne doit pas être supérieure à 0.3.
6. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
7. Lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter 200-300 µl de tampon reconstitué dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel.
8. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puit.
9. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Ajouter 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puit.
12. Laisser incuber pendant 15 minutes (+- 5 minutes) à température ambiante.
13. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à 405nm en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double 405/630 nm en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

### CONTROLE QUALITE

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps.



## RESULTATS

### Calcul des résultats

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

#### 1. DETERMINATION QUALITATIVE

**D.O. Echantillon**

\_\_\_\_\_ X EU/ml étalon = EU/ml Echantillon

**D.O. Etalon**

### Interprétation

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeurs AGA	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif (-)
20 – 25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif (+)

### LIMITES D'UTILISATION

Il est recommandé de ne pas réaliser le test Menarini™ avec des échantillons fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne. Le test doit être réalisé sur des sérums humains uniquement. Les résultats obtenus sont seulement une aide au diagnostic et ne constituent pas un diagnostic en eux-mêmes.

### VALEURS PREVUES

L'incidence des AGA dans différentes maladies est résumée dans le tableau 1 à la fin de ce document.

### PERFORMANCES

Les résultats obtenus avec le test Menarini™ AGA ont été comparés à d'autres kit AGA IgA et IgG pour le diagnostic de la CD. Les résultats sont repris dans le tableau 2 à la fin de ce document.

### Précision

Des échantillons avec concentration connue de AGA ont été testés 10 fois sur une période de deux semaines. Les coefficients de variation intra et inter-essai apparaissent dans le tableau 3 à la fin de ce document.

### Récupération

Des échantillons avec des concentrations connues d'AGA ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues d'AGA. Les niveaux d'anticorps anti-gliadine des échantillons mélangés ont été déterminés et, à partir de ces valeurs, le pourcentage de récupération calculé. Les résultats sont repris dans le tableau 4 à la fin de ce document.



**REFERENCES • BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA**

1. Pare P, Douville P, Coron D, et al. Adult celiac sprue: changes in the pattern of clinical recognition. *J Clin Gastroenterol*; 10:395-400, 1988.
2. Hall MJ, Cooper BT, Rooney H et al. Coeliac disease and malignancy of the duodenum: diagnosis by endoscopy, successful treatment of malignancy and response to gluten free diet. *Gut* 32:90-92, 1991.
3. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65:909-911.
4. Savilahti E, Perkkio M, Kalimo K, et al. IgA antigliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood celiac disease. *Lancet* 1973; I:320-322.
5. Kumar V, Jain N, Lerner A, Beutner EH, Chorzelski TP, Lebenthal E. Comparative studies of different gliadin preparations in detecting antigliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5:730-734.
6. Montgomery AMP, Goka AKJ, Kumar PJ, et al. Low gluten diet in the treatment of adult coeliac disease: effect on jejunal morphology and serum anti-gluten antibodies. *Gut* 1988; 29:1564-1568.
7. Weiss JB, Austin RK, Schanfield MS, et al. Gluten-sensitive enteropathy. IgG heavy-chain (Gm) allotypes and the immune response to wheat gliadin. *J Clin Invest* 1983; 72:96-101.
8. Mearin ML, Konincyx CR, Biemond I, et al. Influence of genetic factors on the serum levels of antigliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:373-377.
9. Levenson SD, Austin RK, Dietler MD, et al. Specificity of antigliadin antibody in celiac disease. *Gastroenterology* 1985; 89:1-5.
10. Lerner A, Lebenthal E. The controversy of antigluten antibody (AGA) as a diagnostic tool in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12:407-409.
11. Lebenthal E, Heitlinger LA. Gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr* 1983; 102:711-712.
12. Kumar V, Lerner A, Jain N, Beutner EH. Are antigliadin antibodies specific for celiac disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3:815.
13. Tucker NT, Barghuthy FS, Prihoda TJ, Kumar V, Lerner A, Lebenthal E. Antigliadin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. *J Pediatr* 1988; 113:286-289.
14. Unsworth DJ, Kieffer M, Holborow EJ, et al. IgA anti-gliadin antibodies in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1981; 46:286-293.
15. Bürgin-Wolff A, Bertele RM, Berger R et al. A reliable screening test for childhood celiac disease: fluorescent immunosorbent test for gliadin antibodies. A prospective multicenter study. *J Pediatr* 1983; 102:655-660.
16. Kelly J, O'Farrelly C, Rees JPR, et al. Humoral response to alpha gliadin as serological screening test for coeliac disease. *Arch Dis Child* 1987; 62:469-473.
17. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).



**Table 1. Incidence of Anti-Gliadin Antibodies**

Condition	Antibody Class	
	IgG	IgA
Confirmed CD		
On Gluten Diet	93%	79%
On Gluten-free Diet	48%	4%
Suspected CD		
On Gluten	100%	85%
Dermatitis herpetiformis	64%	50%
Disease Controls*	26%	2%

\* Patients with malabsorption symptoms, ulcerative colitis, Crohn's and liver disorders

**Table 2. Performance Comparison Menarini™ AGA Screen**

Menarini™ Individual AGA IgG and IgA	Menarini™ AGA Screen		
	Positive	Negative	Total
Positive	69	6	75
Negative	0	51	51
Total	69	57	126

relative specificity: 100.0%

relative sensitivity: 92.0%

relative agreement: 95.2%

**Table 3. Precision**

	inter-assay	intra-assay
	%CV	%CV
Sample 1	8.8	8.2
Sample 2	7.8	6.5

**Table 4. Recovery**

	AGA-Ab conc. added (EU/ml)	AGA-Ab conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	135.9	132.5	97.5
Sample 2	110.9	114.4	103.2
Sample 3	65.7	71.5	108.8



 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**  
via Sette Santi 3  
50131 Firenze  
Italia

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argypopolis  
Attiki

**AT**

**ÖSTERREICH**  
Vertrieb durch  
A. Menarini Ges.m.b.H  
Pottendorfer Straße, 25/27  
A - 1120 Wien

**BE**

**BELGIQUE**  
Distribué par  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4  
1930 Zaventem

**PT**

**PORTUGAL**  
Distribuido por  
A. Menarini Diagnósticos, Lda  
Quinta da Fonte  
Edifício D.Manuel I, 2ºB  
2770-203 Paço de Arcos

**NL**

**NEDERLAND**  
Distributed by  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux N.V.  
De Haak, 8  
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007  
Data de publicação: Março de 2007  
Ausgabedatum: März 2007  
Date d'émission : Mars 2007  
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4117S CE M

