


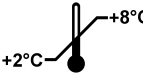




| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>REF 41422</p>  | <h1>ZENIT RA t-TG IgA</h1> |  |
| <p>INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION</p> |    <p style="text-align: right;">100</p> |  |

INDICATIONS

Le test *ZENIT RA t-TG IgA* est un test immunologique chimioluminescent (CLIA) pour la détermination quantitative, au moyen de l'appareil *ZENIT RA Analyser*, des anticorps spécifiques de classe IgA dirigés contre la transglutaminase tissulaire dans des échantillons de sérum ou de plasma humain (EDTA, Héparine).

Le dosage fournit de plus, dans les échantillons qui ne contiennent pas de IgA anti-t-TG, une indication relative à la concentration en IgA totales présente dans l'échantillon

Ce dosage est utilisé comme aide au diagnostic lors de l'évaluation de l'entéropathie due au gluten (maladie coeliaque) et de la dermatite herpétique de Durhing.

ATTENTION: Toute décision médicale ne peut être basée sur le résultat de ce seul test, mais est établie en évaluant l'ensemble de toutes les données cliniques et de laboratoire disponibles.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La maladie coeliaque (MC) ou intolérance alimentaire au gluten est une maladie auto-immunitaire, qui se manifeste chez des sujets génétiquement susceptibles, déclenchée par un régime riche en céréales, tels que le blé, l'orge et le seigle¹.

La prédisposition génétique est liée principalement à certains gènes du système HLA, en particulier aux génotypes DQ2 et DQ8 qui sont présents chez 95-98 % des sujets coeliaques, mais qui se rencontrent avec un pourcentage entre 20 et 30 % dans la population générale^{2,3}. La prévalence de la MC dans la population caucasique est de 1:100 environ, donc un sujet sur 30 qui porte les allèles codifiées par les gènes HLA DQ2/DQ8 développe la MC^{4,5}.

La gliadine est la portion protéique du gluten capable d'enclencher le processus auto-immunitaire ; le contact entre les peptides de la gliadine et les cellules du système immunitaire de la sous-muqueuse intestinale peut avoir lieu suite à une altération de la perméabilité intestinale induite par la zonuline sécrétée par les anthérocytes. La gliadine est un excellent substrat pour l'enzyme transglutaminase tissulaire (t-TG) ; les actions de désamination et transamination sur les peptides gliadiniques de la tTG modifient la charge globale de la molécule en permettant le lien aux antigènes HLA DQ2-DQ8, exprimés par les cellules présentant l'antigène, avec la formation d'un complexe HLA DQ2-DQ8/ peptides désaminés/t-TG. Ce complexe est reconnu par les lymphocytes T CD4⁶ qui amorcent le processus immunologique avec

activation des lymphocytes T effecteurs, production de cytokine, prolifération des lymphocytes B et synthèse des anticorps anti-t-TG⁷ et anti-peptides de la gliadine^{8,9}. Le résultat est un processus inflammatoire avec divers cadres histologiques qui peuvent aboutir à des lésions (réversibles) de la muqueuse intestinale comme l'atrophie villaire.

Les tests sérologiques ont un rôle crucial dans le diagnostic de la MC et dans le contrôle de la compliance au traitement caractérisé par un régime sans gluten. Comme indiqué dans les lignes de conduite internationales, la première approche au diagnostic de la MC est l'exécution d'un test pour la recherche d'auto-anticorps anti-t-TG de classe IgA en association au test pour le dosage des IgA totales ; cette procédure est suggérée car les sujets avec déficit absolu en IgA (IgA \leq 5 mg/dl)¹⁰ ont un risque relatif de développer la MC 10 fois supérieur à la population normale¹¹.

La sensibilité élevée et la spécificité des auto-anticorps anti-transglutaminase IgA, respectivement de 96-98 % et de 93-95 %¹², associée à l'objectivité et à l'automatisation complète du test ont fait que la recherche des anti-t-TG IgA a remplacé au fil de ces dernières années les autres enquêtes sérologiques pour la MC¹³. La recherche des anti-endomysiaux (EMA) IgA revêt cependant un rôle de confirmation important pour tous les sérums positifs anti-t-TG IgA, justement grâce à la sensibilité très élevée (99-100 %) des EMA mêmes si les aspects interprétatifs de ce test restent importants. Dans les déficits sélectifs en IgA, il faut réaliser l'exécution des anti-t-TG IgG en association aux anticorps anti-peptides désaminés de la gliadine (a-DGP) IgG.

Il a été récemment démontré que les sujets coeliaques synthétisent des anticorps spécifiques dirigés contre les peptides désaminés de la gliadine. Les anticorps anti-DGP restent très spécifiques pour l'identification des sujets avec intolérance au gluten, contrairement aux anticorps anti-gliadine total, que l'on retrouve chez les sujets sains ou avec d'autres pathologies de l'appareil digestif et ayant donc une spécificité réduite¹⁴.

Les anticorps anti-DGP de classe IgA présentent une sensibilité de 86-95 % et une spécificité de 91-95 %, tandis que ceux de classe IgG présentent une sensibilité de 84-98 % et une spécificité de 95-98 %; ces prestations ne suggèrent pas l'utilisation chez les sujets pédiatriques¹⁵ où la synthèse de ces anticorps semble précéder celle des anti-transglutaminase IgA. De plus, l'utilisation des test pour les anticorps anti-DGP, tant de classe IgA que IgG, est conseillé indépendamment de l'âge chez tous les sujets avec des symptômes indiquant la MC chez lesquels les auto-anticorps t-TG ou EMA sont absents ou présentent des titres très bas¹⁶.

Chez les patients coeliaques sous régime sans gluten, on assiste à une diminution progressive des anticorps anti-t-TG et anti-gliadine. La diminution du titre des anticorps de classe IgG est plus lente par rapport à celle des anticorps de classe IgA.

PRINCIPE DE LA METHODE

Le kit *ZENIT RA t-TG IgA* pour la détermination quantitative des IgA spécifiques anti-t-TG utilise une méthode immunologique indirecte à deux étapes basée sur le principe de la chimioluminescence.

L'antigène spécifique est utilisé pour recouvrir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps anti-IgA humaines est marqué avec un dérivé d'ester d'acridinium (conjugué).

Durant la première incubation, les anticorps spécifiques se trouvant dans l'échantillon, les étalons ou dans les contrôles se lient à la phase solide.

Durant la deuxième incubation, le conjugué réagit avec les anticorps anti-t-TG IgG séquestrés par la phase solide.

Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est enlevé par aspiration et lavage successif.

La quantité de conjugué marqué qui est resté lié à la phase solide est évaluée à travers l'activation de la réaction de chimioluminescence et mesure du signal lumineux. Le signal généré, exprimé en unités relatives de lumière (RLU, Relative Light Unit), est indicatif de la concentration des anticorps spécifiques se trouvant dans l'échantillon, dans les étalons et dans les contrôles.

L'ajout à la phase solide spécifique de microparticules sensibilisées avec anticorps monoclonal de rat anti-IgA humaines permet de déterminer aussi dans le même dosage les IgA totales présentes dans les échantillons qui ne contiennent pas d'anticorps IgA anti-t-TG, exploitant le principe des méthodes immunométriques sandwich.

Durant la première incubation, les IgA présents dans l'échantillon se lient à la phase solide sensibilisée avec les anticorps anti-IgA humaines.

Durant la deuxième incubation, le conjugué réagit avec les IgA séquestrés par la phase solide.

Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est enlevé par aspiration et lavage successif.

La quantité de conjugué marqué qui est resté lié à la phase solide est évaluée à travers l'activation de la réaction de chimioluminescence et mesure du signal lumineux. Le signal généré, exprimé en unités relatives de lumière (RLU, Relative Light Unit), est indicatif de la concentration en IgA se trouvant dans les échantillons qui ne contiennent pas d'anticorps anti-t-TG IgA.

L'utilisation d'une courbe standard constituée de solutions à contenu connu en IgA permet de transformer le signal mesuré en concentration en IgA. Afin d'utiliser une courbe standard utile tant pour la détermination des anticorps IgA anti-t-TG que des IgA totales, la concentration de ces dernières est exprimée arbitrairement en UA/mL à travers l'utilisation du facteur de conversion suivant : 25 mg/dL d'IgA = 0.8 UA/mL.

AUTOMATISATION

L'appareil *ZENIT RA Analyser* effectue en automatique toutes les opérations prévues par le protocole de dosage : ajout dans le récipient de réaction des échantillons, étalons, contrôles, particules magnétiques, conjugué et solutions d'activation de la chimioluminescence ; séparation magnétique et lavage des particules; mesure de la lumière émise.

Le système calcule les résultats du dosage pour les échantillons et les contrôles à travers une courbe de calibration mémorisée et imprime un rapport qui comprend toutes les informations relatives au dosage et au patient.

MATERIELS ET REACTIFS

Matériels et réactifs fournis

| | | | |
|------|---|----|--------|
| REAG | 1 | MP | 2.5 mL |
|------|---|----|--------|

Particules magnétiques recouvertes de l'antigène t-TG et particules magnétiques sensibilisées avec des anticorps monoclonaux de rat anti-IgA humaines dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes, tensioactif, Pro-Clin 300 et azide de sodium (< 0.1 %) comme conservateurs.

| | | | |
|------|---|------|-------|
| REAG | 2 | CONJ | 25 mL |
|------|---|------|-------|

Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgA humaines marqué avec un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué), dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes et azide de sodium (< 0.1 %) comme conservateur.

| | | | |
|------|---|-----|-------|
| REAG | 3 | DIL | 25 mL |
|------|---|-----|-------|

Solution de Dilution Echantillons: Tampon Phosphaté contenant de l'albumen sérique bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, Pro-Clin 300 et Gentamicine SO₄ comme conservateurs.

| | | | |
|------|---|-------|--------|
| REAG | 4 | CAL A | 1.6 mL |
|------|---|-------|--------|

Sérum humain à faible concentration en anticorps anti-t-TG IgA dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumen sérique bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, Pro-Clin 300 et Gentamicine SO₄ comme conservateurs.

| | | | |
|------|---|-------|--------|
| REAG | 5 | CAL B | 1.6 mL |
|------|---|-------|--------|

Sérum humain à forte concentration en anticorps anti-t-TG IgA dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumen sérique bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, Pro-Clin 300 et Gentamicine SO₄ comme conservateurs

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

Les réactifs 1, 2 et 3 sont assemblés dans un seul ensemble qui constitue la cartouche réactifs.

Les concentrations des Etalons sont exprimées en UA/mL (Unités Arbitraires) et tarées par rapport à un standard de référence interne. Les valeurs des concentrations, spécifiques par lot de produit, sont enregistrées dans le DATA DISK inséré dans le kit.

| |
|-----------|
| DATA DISK |
|-----------|

Mini-DVD contenant les informations concernant tous les produits de la Ligne ZENIT RA (Réactifs, Etalons, Sérums de contrôle, Réactifs auxiliaires) mises à jour au dernier lot de production à l'exclusion des produits périmés à la date de rédaction du nouveau DATA DISK.

Il suffit de conserver le DATA DISK avec le numéro de lot le plus élevé pour maintenir à jour les informations requises pour le fonctionnement correct du système.

Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis dans le kit

- ZENIT RA Analyzer Cod. No. 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube Cod. No. 41402
Conditionnement de 960 cuvettes.
- ZENIT RA System Liquid Cod. No. 41409
1 bouteille de 0,5 litre de solution 10x.
- ZENIT RA Wash Solution Cod. No. 41407
1 bouteille de 0,5 litre de solution 20x.
- ZENIT RA TrlgAer Set Cod. No. 41403
1 flacon de 250 mL de Trigger A (solution de préactivation)
1 flacon de 250 mL de Trigger B (solution d'activation)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cod. No. 41436
Conditionnement de 2 bouteilles de 1 litre de solution prête à l'usage.
- ZENIT RA Cartridge Checking System Cod. No. 41401
- ZENIT RA Top Cap Set Cod. No. 41566
300 bouchons supérieurs pour la fermeture des récipients des étalons après la première utilisation.

Autres réactifs recommandés

- ZENIT RA CELIAC CONTROL SET Cod. No. 41452
3 flacons de 1.5 mL de sérum humain négatif et 3 flacons de 1.5 mL de sérum humain positif pour anticorps anti-t-TG.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Les réactifs fournis dans le kit *ZENIT RA t-TG IgA* sont destinés uniquement à un usage diagnostique in vitro et non à l'usage in vivo chez l'homme ou l'animal.

Ce produit doit être utilisé en respectant étroitement les instructions reportées sur ce document et par des utilisateurs professionnels.

La société Menarini ne peut être tenue responsable de pertes ou dommages engendrés par une utilisation non conforme aux instructions fournies.

Précautions de sécurité

Ce produit contient du matériel d'origine animale et doit donc être manipulé comme s'il contenait des agents infectieux.

Ce produit contient des composés d'origine humaine. Toutes les unités de sérum ou plasma utilisées pour la fabrication des réactifs de ce kit ont été analysées avec des méthodes approuvées par la FDA et ont été trouvées non réactives pour la présence de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 et anti-HIV2.

Cependant, puisque aucune méthode d'analyse n'est capable de garantir l'absence d'agents pathogènes, tout le matériel d'origine humaine doit être considéré potentiellement infecté et doit être manipulé comme tel. En cas d'emballage abîmé avec déversement des réactifs, effectuer la décontamination de la zone intéressée avec une solution diluée d'Hypochlorite de Sodium après s'être protégé avec des dispositifs de protection individuelle adaptés (tablier, gants, lunettes).

Effectuer l'élimination du matériel utilisé pour le nettoyage et des déchets d'emballage impliqués dans le déversement sur base des normes nationales pour l'élimination des déchets potentiellement infectés.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Vu que l'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton pour former des azides explosifs dans les canalisations, il est recommandé de ne pas éliminer les réactifs ou les déchets dans l'évier mais de suivre les normes nationales en matière d'élimination de déchets potentiellement dangereux.

Précautions opérationnelles

Pour obtenir des résultats fiables, il faut s'en tenir étroitement à ces Instructions pour l'utilisation et suivre scrupuleusement ce qui est indiqué dans le manuel opérationnel de l'appareil.

Les réactifs fournis dans le kit doivent être utilisés exclusivement avec le système *ZENIT RA Analyzer*.

Les composants de la cartouche réactifs ne peuvent être enlevés de la cartouche et remis ensemble.

Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs fournis dans le kit sont tous prêts à l'emploi.

CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs fournis dans le kit à 2-8 °C en position verticale et à l'obscurité.

Dans ces conditions, la cartouche réactifs et les étalons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption.

La cartouche réactifs peut être utilisée pendant 60 jours après l'ouverture si elle est conservée au frigo à 2-8 °C ou bien dans l'appareil.

Les étalons peuvent être utilisés pendant 60 jours après l'ouverture s'ils sont conservés au frigo à 2-8 °C et si la permanence dans l'appareil ne dépasse pas 6 heures par séance.

Ne pas congeler les réactifs et les étalons.

PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le dosage doit être effectué sur des échantillons humains de sérum ou plasma (EDTA - Héparine).

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés et troubles est déconseillée.

Si le dosage est effectué après plus de 8 heures du prélèvement, séparer le sérum du coagulat ou le plasma des globules rouges en le transférant des éprouvettes primaires de séparation avec gel dans les éprouvettes secondaires sans additifs.

Avant d'être analysés, les échantillons peuvent être conservés au frigo à 2-8 °C pendant 7 jours maximum.

Si le dosage est effectué après plus de 7 jours, conserver les échantillons congelés (< - 20 °C).

Eviter les congélations et décongélations successives.

PROCEDURE DE DOSAGE

Pour obtenir des prestations analytiques fiables, s'en tenir scrupuleusement aux instructions reportées dans le manuel opérationnel de l'appareil.

Chargement des réactifs

Tous les réactifs fournis dans le kit sont prêts à l'usage.

Avant d'insérer la cartouche réactifs dans le système, le récipient des particules magnétiques doit être agité horizontalement par rotation de façon à favoriser la remise en suspension des particules. Effectuer l'opération en évitant la formation de mousse.

Placer la cartouche réactifs dans la zone réactifs de l'appareil en utilisant le guide spécial et laisser en agitation pendant au moins 30 minutes avant l'utilisation.

Le placement de la cartouche réactifs détermine en même temps la lecture du code à barres d'identification. En cas d'endommagement de l'étiquette de la cartouche ou en cas de non lecture, les données d'identification de la cartouche réactifs peuvent être insérées manuellement.

L'appareil maintient automatiquement en agitation continue les particules magnétiques.

Si la cartouche réactifs est enlevée de l'appareil, la conserver verticalement à l'obscurité à 2-8 °C.

Chargement des étalons et des contrôles

Les étalons et les contrôles ZENIT RA sont prêts à l'usage. Laisser les étalons et les contrôles à température ambiante pendant 10 minutes et agiter délicatement le contenu, manuellement ou au moyen du vortex, en évitant la formation de mousse. Ne pas retourner le récipient et ne pas enlever le bouchon perforateur de fermeture (bouchon jaune pour les étalons et bouchons verts pour les contrôles).

Dans le cas où les étalons ou les contrôles sont utilisés pour la première fois, pousser le bouchon perforateur vers le bas jusqu'au bout de sa course. Par cette opération, la membrane qui scelle le récipient sera perforée rendant possible le prélèvement du liquide contenu. L'abaissement du bouchon perforateur est signalé par la couverture simultanée de la bande de couleur rouge se trouvant sur le côté supérieur de l'étiquette (Fig. 1 – Récipient scellé et Récipient perforé).

Au cas où les étalons ou les contrôles ont déjà été utilisés, le récipient sera équipé du bouchon supérieur (bouchon blanc) et la bande rouge de l'étiquette sera couverte.

Il ne faut charger sur l'appareil exclusivement que les récipients sans bouchon supérieur (bouchon blanc) et avec la bande rouge de l'étiquette couverte (Fig. 1 – Récipient perforé).

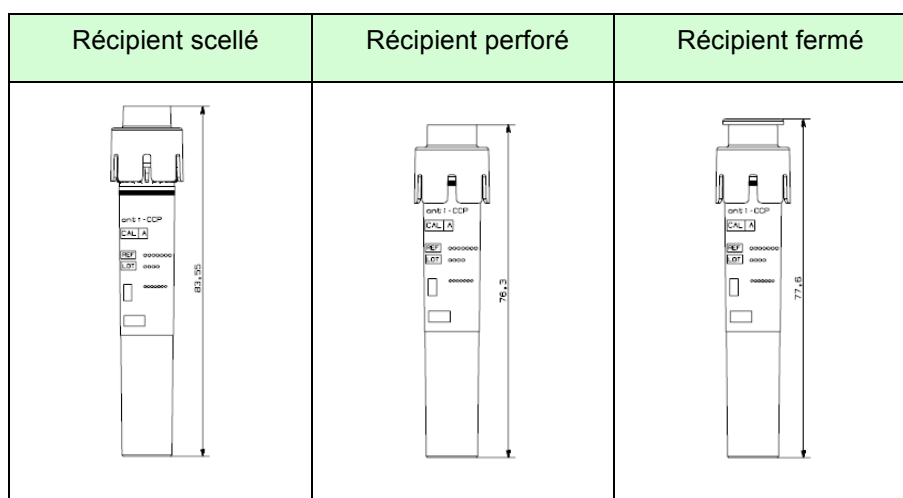
Insérer dans l'appareil les étalons ou les contrôles dans la zone échantillons après lecture du code à barres. Les données du code à barres peuvent aussi être insérées manuellement en cas d'endommagement de l'étiquette ou en cas d'absence de lecture.

Les valeurs de la concentration des anticorps IgA anti-t-TG présente dans les étalons ou les contrôles sont enregistrées dans le DATA DISK et automatiquement transférées dans l'appareil. En cas de non transfert des données, on peut les insérer manuellement.

A la fin de la séance, les récipients des étalons et des contrôles doivent être fermés avec les bouchons supérieurs prévus (bouchon blanc) et transférés à 2-8 °C jusqu'à leur prochaine utilisation (Fig. 1 – Récipient fermé).

Les étalons peuvent être utilisés quatre fois maximum.

Figure 1: Layout récipient



Chargement des échantillons

Identifier les échantillons en utilisant le lecteur codes à barres et les insérer dans l'appareil, dans le récipient prévu. En cas d'absence de code à barres sur l'échantillon ou en cas de non lecture, les données d'identification de l'échantillon peuvent être insérées manuellement.

Sélectionner les paramètres requis pour chaque échantillon.

Calibration

L'appareil *ZENIT RA Analyzer* utilise une courbe de calibration mémorisée (master curve), créée par le producteur pour chaque lot de cartouche réactifs.

Les paramètres des "master curve", ainsi que les valeurs des concentrations des étalons, sont mémorisées dans le DATA DISK et transférés dans le database de l'appareil.

Les étalons A et B sont utilisés pour réétalonner la "master curve" en fonction tant de l'appareil que des réactifs à bord.

Pour effectuer le réétalonnage, analyser trois fois les deux étalons A et B et une fois les contrôles. Les valeurs de concentration obtenues avec les contrôles permettent de valider la nouvelle calibration.

Une fois que le réétalonnage de la "master curve" a été accepté et mémorisé, tous les échantillons successifs peuvent être analysés sans étalonnage supplémentaire, sauf dans les cas suivants:

- quand on charge dans l'appareil une cartouche réactifs avec un nouveau lot;
- quand les valeurs des contrôles ne rentrent pas dans l'intervalle d'acceptabilité;
- quand on effectue la procédure d'entretien de l'appareil;
- quand la validité de la "master curve" réétalonnée est périmée.

La validité de la "master curve" réétalonnée pour le kit *ZENIT RA t-TG IgA* est de 15 jours.

La gestion du réétalonnage est mise en œuvre automatiquement par l'appareil.

Dosage

Appuyer sur la touche de mise en route.

1. Le système aspire 100 µL de Diluant Echantillons, 20 µL de Particules Magnétiques, 100 µL de Diluant Echantillons et 4 µL d'échantillon ou contrôle (pour les étalons, le sérum positif est fourni pré-dilué avec le Diluant Echantillons et le volume prélevé est de 104 µL). Les solutions et la suspension aspirées sont distribuées dans la cuvette de réaction.
2. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
3. Après cette phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées.
4. Dans la cuvette, on distribue 200 µL de conjugué.
5. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
6. Après cette dernière phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées et la cuvette est transférée dans la chambre de lecture.
7. La quantité de conjugué lié à la phase solide, exprimée en RLU, est directement proportionnelle à la concentration de IgA anti-tTG se trouvant dans l'échantillon.
8. Les réponses obtenues sont interpolées sur la courbe de tarage et transformées en concentrations.

Les échantillons avec des valeurs de concentration plus élevées que la limite supérieure de l'intervalle de mesure peuvent être dilués ou retestés. La nouvelle valeur obtenue est multipliée par le facteur de dilution utilisé pour obtenir le résultat final.

CONTROLE QUALITE

Pour assurer la validité du dosage, des sérums de contrôles à différents niveaux de concentration (au moins un sérum négatif et un sérum positif) doivent être mesurés chaque jour où l'on effectue un dosage.

Si le laboratoire le demande, pour la vérification des dosages, une utilisation plus fréquente ou un nombre plus élevés de contrôles, suivre les procédures de contrôle qualité qui y sont établies.

Si l'on utilise les sérums de contrôle ZENIT RA, les valeurs moyennes attendues et les limites d'acceptabilité sont celles reportées dans le DATA DISK se trouvant aussi dans l'emballage des produits.

Si l'on utilise d'autres sérums de contrôle, il faut, avant leur utilisation, définir les valeurs attendues avec les réactifs et le système ZENIT RA.

Si la valeur des contrôles ne rentrait pas dans la fourchette d'acceptabilité spécifiée, les résultats relatifs du dosage ne seraient pas valides et les échantillons respectifs devraient être à nouveau analysés.

Dans ce cas, il faut effectuer une procédure de réétalonnage avant la répétition du dosage.

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Calcul des résultats

La concentration des anticorps IgA anti-t-TG présente dans les échantillons en examen est calculée automatiquement par le système. Les valeurs peuvent être visualisées au travers de la lecture sur le vidéo ou par impression.

Les concentrations sont exprimées en UA/mL.

Le calcul de la concentration en composés à analyser dans l'échantillon se fait à travers la lecture de la réponse obtenue pour chaque échantillon sur une courbe d'étalonnage élaborée au travers d'un système de "fitting" logistique à quatre paramètres (4PL, Y pondéré), corrigée périodiquement en fonction des réponses obtenues dans le dosage des étalons.

Pour des informations détaillées sur comment le système calcule les résultats, consulter le manuel opérationnel du système.

Interprétation des résultats

La gamme de mesure du dosage ZENIT RA t-TG IgA est: 0.0 – 200 UA/mL.

Les valeurs inférieures à 0.0 UA/mL sont des valeurs extrapolées et peuvent être reportées comme "égales à 0.0 UA/mL".

Les valeurs supérieures à 200 UA/mL peuvent être reportées comme "supérieures à 200 UA/mL", ou retestées après dilution opportune.

Les résultats des échantillons peuvent être interprétés de la façon suivante:

| (UA/mL) | Interprétation |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|
| < 0.8 | L'échantillon peut présenter un déficit en IgA (< 25 mg/dL) |
| 0.8 ÷ 9.9 | L'échantillon doit être considéré Négatif pour la présence de IgA anti-t-TG |
| ≥ 10 | L'échantillon doit être considéré Positif pour la présence de IgA anti-t-TG |

Les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées uniquement comme des valeurs suggérées. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles de référence.

LIMITES DU DOSAGE

Pour les fins diagnostiques, les résultats obtenus avec le kit *ZENIT RA t-TG IgA* et le système *ZENIT RA Analyzer* doivent être utilisés en association à d'autres données cliniques et de laboratoire à disposition du médecin.

La contamination bactérienne des échantillons et l'inactivation à la chaleur peuvent influencer le résultat du dosage.

Les anticorps hétérophiles présents dans les échantillons de sérum humain peuvent réagir avec les réactifs à base d'immunoglobuline, en causant des interférences dans les dosages immunologiques in vitro. Ces échantillons peuvent donner lieu à des valeurs anormales s'ils sont analysés avec le kit *ZENIT RA t-TG IgA*.

VALEURS ATTENDUES

On a analysé les échantillons de 100 donneurs sélectionnés au hasard pour vérifier la présence d'anticorps IgA anti-t-TG.

Tous les échantillons analysés étaient négatifs, avec une valeur moyenne de 2.5 UA/mL et une déviation standard de 0.53 UA/mL.

Avec les résultats obtenus, on a calculé la "Limit of Blank" (LoB = la plus grande valeur que l'on puisse attendre d'une série d'échantillons qui ne contiennent pas le composé à analyser). La "Limit of Blank", déterminée comme le 95° percentile de la population négative, est égale à 3.4 UA/mL avec le lot de réactifs n. 2.

SENSIBILITE ET SPECIFICITE CLINIQUE

Un total de 62 échantillons coeliaques de premier diagnostic, confirmés par examen histologique, et 90 échantillons non coeliaques (60 donneurs et 30 patients atteints de pathologies inflammatoires et fonctionnelles de l'intestin), ont été testés avec le kit *ZENIT RA t-TG IgA*. Tous les échantillons présentaient une concentration en IgA totaux, déterminée par la méthode immunonéphélométrique, comprise dans la gamme de normalité.

Dans la population supposée négative (non cœliaque) étudiée, 3 échantillons, appartenant au groupe avec pathologies intestinales, étaient positifs et 87 échantillons ont été trouvés négatifs:

- **Spécificité diagnostique: 96.7 %**

Dans la population supposée positive (coeliaque) étudiée, 1 échantillon était négatif et 61 échantillons ont été trouvés positifs:

- **Sensibilité diagnostique: 98.4 %**

Sur base des résultats de la spécificité et de la sensibilité diagnostique, l'**accord diagnostique est de 97.4 %**.

On a de plus analysé 22 échantillons avec déficit en IgA, confirmé par dosage immunonéphélométrique (valeurs inférieures à 5mg/dL). Tous les échantillons ont fourni avec la méthode *ZENIT RA t-TG IgA* des résultats inférieurs à 0.8UA/mL (correspondant à une concentration de 25 mg/dL de IgA totaux).

PERFORMANCES

Avertissement: les données présentées ne représentent pas les spécifications de fonctionnement du kit mais constituent une preuve expérimentale de comment fonctionne le kit dans ces spécifications de la façon prévue par le producteur.

Précision et Reproductibilité

La précision et reproductibilité du kit *ZENIT RA t-TG IgA* ont été évaluées en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP5-A2 des Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **précision** a été calculée en analysant les résultats de 20 réplifications de cinq sérums (un négatif et quatre positifs avec différentes concentrations en anti-t-TG IgA) réalisées avec deux lots différents de réactifs durant la même séance expérimentale.

La concentration du sérum anti-t-TG IgA négatif (N4) est comprise dans un intervalle de 2.2 à 2.8 UA/mL et de 2.1 à 2.7 UA/mL respectivement pour le lot de réactifs n°1 et n°2.

Dans le tableau sont reportés les résultats obtenus avec les 4 sérums positifs.

| Echantillon | Réactifs Lot. n° | Concentration moyenne (UA/mL) | DS | CV % |
|-------------|------------------|-------------------------------|------|------|
| P1 | 1 | 10.4 | 0.39 | 3.8 |
| | 2 | 10.8 | 0.45 | 4.2 |
| P2 | 1 | 16.0 | 0.49 | 3.1 |
| | 2 | 15.6 | 0.70 | 4.5 |
| P3 | 1 | 39.8 | 1.38 | 3.5 |
| | 2 | 41.1 | 1.74 | 4.2 |
| P4 | 1 | 118.2 | 7.88 | 6.7 |
| | 2 | 117.9 | 3.62 | 3.1 |

La **reproductibilité** a été calculée en analysant les résultats de la détermination de cinq sérums (un négatif et quatre positifs avec différentes concentrations en anti-t-TG IgA) réalisée en simple avec deux lots de réactifs différents, en 15 séances différentes.

La concentration dans le sérum anti-t-TG IgA négatif (N4) est comprise dans l'intervalle de 2.7 à 3.1 UA/mL et de 2.6 à 3.2 UA/mL respectivement pour le lot de réactifs n°1 et n°2.

Dans le tableau sont reportés les résultats obtenus avec les 4 sérums positifs.

| Echantillon | Réactifs Lot. n° | Concentration moyenne (UA/mL) | DS | CV % |
|-------------|------------------|-------------------------------|------|------|
| P1 | 1 | 11.0 | 0.45 | 4.1 |
| | 2 | 11.0 | 0.25 | 2.3 |
| P2 | 1 | 15.4 | 0.67 | 4.4 |
| | 2 | 15.6 | 0.53 | 3.4 |
| P3 | 1 | 39.1 | 1.44 | 3.7 |
| | 2 | 40.3 | 1.40 | 3.5 |
| P4 | 1 | 112.5 | 4.58 | 4.1 |
| | 2 | 114.6 | 4.94 | 4.3 |

Linéarité des Dilutions

La linéarité des dilutions du kit ZENIT RA t-TG IgA a été évaluée en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP6-A des Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

On a dosé des dilutions scalaires de 3 sérums à forte concentration en IgA anti-t-TG, réalisées avec le Diluant Echantillons.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant.

| Echantillon | Facteur de dilution | Concentration mesurée (UA/mL) | Concentration attendue (UA/mL) | Recouvrement % |
|-------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------|
| 1 | 1 | 99.3 | - | (100) |
| | 2 | 44.2 | 49.7 | 88.9 |
| | 4 | 24.5 | 24.8 | 98.8 |
| | 8 | 12.1 | 12.4 | 97.8 |
| 2 | 1 | 144.9 | - | (100) |
| | 2 | 66.5 | 72.5 | 91.7 |
| | 4 | 31.1 | 36.2 | 85.9 |
| | 8 | 14.3 | 18.1 | 79.0 |
| 3 | 1 | 140.1 | - | (100) |
| | 2 | 71.0 | 70.1 | 101.3 |
| | 4 | 34.2 | 35.0 | 97.7 |
| | 8 | 15.3 | 17.5 | 87.4 |

Dans tous les cas, il faut souligner que tous les sérums, lorsqu'ils sont mesurés à des dilutions différentes, ne peuvent fournir des résultats linéaires à l'intérieur de l'intervalle de mesure, vu que le résultat dépend non seulement de la concentration mais aussi de l'affinité des anticorps présents dans l'échantillon.

Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique du kit *ZENIT RA t-TG IgA*, exprimée comme **limite de détection** (*Limit of Detection – LoD*: c'est à dire la plus petite quantité de composé à analyser que la méthode est capable de mesurer) a été évaluée en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP17-A des Clinical and Laboratory Standards (CLSI) et la formule pour le calcul $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (où LoB représente la valeur de la "Limit of Blank", SD_s la déviation standard estimée de la distribution de l'échantillon à faible concentration et C_{β} est dérivé du 95 ° percentile de la distribution standard gaussienne).

On a utilisé 3 échantillons de faible concentration en composé à analyser, déterminés en simple avec deux lots de réactifs différents dans 15 séances différentes.

La limite de détection du kit *ZENIT RA t-TG IgA* a été de 4.7 UA/mL.

Les valeurs de la limite de détection, ainsi que les considérations de caractère clinique et les résultats de comparaison avec des méthodes de référence ont contribué à la définition de la valeur de cut-off.

Spécificité Analytique: Interférences

Une étude basée sur les lignes de conduite du document EP7-A2 du CLSI a démontré que les prestations du dosage ne sont pas influencées par la présence dans l'échantillon des substances potentiellement interférentes se trouvant dans la liste du tableau suivant, jusqu'à la concentration testée.

| Substances potentiellement interférentes | Concentration maximale testée |
|------------------------------------------|-------------------------------|
| Bilirubine libre | 20 mg/dL |
| Bilirubine conjuguée | 28 mg/dL |
| Hémoglobine | 1000 mg/dL |
| Acides gras | 3000 mg/dL |

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles est toutefois déconseillée.

Effet saturation à fortes doses

Certaines méthodes immunologiques employées pour la détermination d'échantillons contenant le composé à analyser à des concentrations extrêmement élevées peuvent fournir des niveaux apparents de composés sous-estimés (Effet hook).

La méthode utilisée dans le kit *ZENIT RA t-TG IgA*, étant une méthode à deux incubations, ne subit pas de cet effet.

Un échantillon avec une concentration extrêmement élevée (au-delà de l'intervalle de mesure) en IgA anti-t-TG a confirmé l'absence d'effet "hook" jusqu'à une concentration de 17.400 UA/mL.

Sensibilité et Spécificité Relative

La présence d'anticorps anti-t-TG IgA a été déterminée en utilisant le kit *ZENIT RA t-TG IgA* et une méthode de dosage ELISA disponible dans le commerce sur 144 échantillons.

Les échantillons analysés appartenait à des patients cœliaques de premier diagnostic, patients cœliaques au régime, patients cœliaques et non cœliaques avec déficit en IgA et patients normaux.

11 échantillons ont donné lieu à des résultats discordants entre le dosage ZENIT RA et le dosage disponible dans le commerce.

La concordance relative est donc égale à 92.4 % (133/144).

La sensibilité relative est égale à 98 % (50/51).

L'échantillon discordant appartenait au groupe des patients cœliaques au régime.

La spécificité relative est égale à 89.2 % (83/93).

Des 10 échantillons discordants, 1 appartenait au groupe des cœliaques au premier diagnostic et 9 au groupe des patients cœliaques au régime.

BIBLIOGRAPHIE

1. Stern M, Cicilitira P, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Mendez E, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterology Hepatol* 2001; 13:741-7.
2. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993; 105:910-22.
3. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, et al. HLA-DQ relative risk for celiac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 2004; 63: 562-7.
4. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 342:200-3.
5. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of coeliac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348: 2517-24.
6. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol* 2005; 175: 254-61.
7. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801.
8. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggener M. Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem* 2001; 47: 2023-8.
9. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, Ritcher T, Stern M, Conrad K, et al. Serological assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clin Chem* 2004; 50: 2370-5.
10. Latiff AH, Kerr MA. The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. *Ann Clin Biochem* 2007; 44:131-9.
11. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR, and the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" working groups on celiac disease. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 1998; 42: 362-5.
12. Roston A, Dubè C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al. The diagnostic accuracy of serological test for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128:S38-46.
13. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, et al. The role of anti-tissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of celiac disease: a French-Italian multicentre study. *J Clin Pathol* 2003; 56:389-93.

14. Berger R, Schimdt G. Evaluation of six anti-gliadin antibody assays. J Immunol Methods 1996; 191:77-86.
15. Basso D, Guariso G, Fogar P, Meneghel A, Zambon CF, Navaglia F, et al. Antibodies against syntetic deamidated gliadin peptides for celiac disease diagnosis and follow up in children. Clin Chem 2009; 55: 150-7
16. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, Bizzarro N, Villalta D, Bozzoli R, et al. Diagnostic efficacy of the ELISA tests for the detection of deamidated anti gliadin antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. J Clin Lab Anal. 2009; 23(3): 172-4.

**TECHNOGENETICS S.r.l.**

Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italie

FRANCE**Distribué par**

A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura - BP 70511- 94633 Rungis Cedex
Tel. +33 1 56 34 69 10 - Fax +33 1 56 34 69 11
www.menarinidiagnostics.fr

BELGIQUE et LUXEMBOURG**Distribué par**

Menarini Diagnostics Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4 - 1930 Zaventem
Tel. +32 2 72 14 545 - Fax +32 2 72 09 292
www.menarinidiagnostics.be