

# CELIAC-DOT

**REF** HM 047 IgG 
**REF** HM 048 IgA 
**Français**

## DÉFINITION

Le coffret **CELIAC-DOT** constitue une méthode d'identification qualitative d'autoanticorps sur support membranaire.

↳ **CELIAC-DOT IgA** permet la recherche simultanée des autoanticorps humains d'isotype IgA dirigés contre la gliadine et l'enzyme Transglutaminase Tissulaire.

↳ **CELIAC-DOT IgG** permet la recherche des autoanticorps humains d'isotype IgG dirigés contre la gliadine et l'enzyme Transglutaminase Tissulaire.

## INTERET DIAGNOSTIQUE

La maladie coeliaque (MC) est associée à un syndrome de malabsorption, une perte de poids et de fréquentes douleurs abdominales. C'est, à la fois une intolérance au gluten contre lequel sont dirigés des anticorps anti-gliadine (fraction protéique du gluten), et une maladie autoimmune par la présence d'autoanticorps contre l'endomysium des fibres musculaires, la réticuline et, plus récemment découverte comme étant le principal antigène reconnu par les anti-endomysium, la transglutaminase tissulaire (tTG). La recherche de ces anticorps est nécessaire au dépistage de la maladie et au suivi de son traitement : le régime sans gluten.

Les anticorps anti-gliadine d'isotype IgG et IgA ont une spécificité moindre par rapport aux anti-endomysium ou anti-tTG mais ils semblent cependant intéressants, d'une part chez les enfants de moins de deux ans chez lesquels les IgA anti-gliadine pourraient apparaître avant les IgA anti-endomysium et, d'autre part, en cas de déficit sélectif en IgA. Les anticorps anti-réticuline sont considérés comme moins sensibles que les précédents. Enfin le titre des anti-gliadine et des anti-endomysium ou anti-tTG diminue en quelques mois au cours d'un régime sans gluten bien suivi, et augmente à nouveau en cas d'écart de régime.

Le dosage combiné des anticorps anti-gliadine et anti-tTG chez l'adulte et chez l'enfant représente une technique sérologique simple, rapide, sensible et spécifique de dépistage et de suivi de traitement :

\* la présence simultanée d'anticorps anti-gliadine et anti-tTG d'isotype IgA accompagnée ou non d'anticorps d'isotype IgG permet un diagnostic quasi certain d'une MC et une indication à pratiquer une biopsie duodénojunale.

\* la présence d'anti-gliadine IgA et IgG constitue un diagnostic possible d'une MC en fonction des éléments cliniques.

\* la présence d'anticorps anti-tTG uniquement d'isotype IgG est en faveur d'une maladie coeliaque, pour les patients ayant un éventuel déficit en anticorps d'isotype IgA.

\* la présence d'anticorps anti-gliadine uniquement d'isotype IgG n'est pas en faveur d'une maladie coeliaque, il faut cependant tenir compte d'un éventuel déficit en IgA.

## PRINCIPE DU TEST

Les antigènes sont adsorbés sur un support membranaire constitué de 3 puits distincts.


• Dans un premier temps, la membrane est plongée dans un tube réactionnel contenant l'échantillon à tester. S'il contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer aux antigènes correspondants. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.

• La bandelette est ensuite plongée dans une solution d'activation. Après incubation, un deuxième lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.

• Un conjugué, couplé à la phosphatase alcaline, viendra ensuite se fixer aux complexes précédemment capturés. Après incubation, un dernier lavage permet d'éliminer tout excès de conjugué.

• L'étape de chromogénèse est réalisée en utilisant un substrat insoluble de la phosphatase (BCIP/NBT). Au cours de celle-ci apparaissent des spots de couleur bleue, traduisant la présence d'autoanticorps dans l'échantillon testé.

## COMPOSITION DU COFFRET

	HM047	HM048
Bandelettes réactives constitués de 3 puits distincts		
 <p>Contrôle + Gliadine tTG</p> <p><b>STRIP</b></p>	<p>Antigènes coâtés : - Gliadine naturelle et - transglutaminase tissulaire (tTG) humaine recombinante</p> <p>25</p>	<p>25</p>
<p>Un flacon de Conjugué IgA-PAL (IgA couplée à la phosphatase alcaline) <u>A diluer</u></p> <p><b>CONJ</b> <b>IgA</b></p>		<p>650 µl</p>
<p>Un flacon de Conjugué IgG-PAL (IgG couplée à la phosphatase alcaline) <u>A diluer</u></p> <p><b>CONJ</b> <b>IgG</b></p>	<p>650 µl</p>	
<p>Un flacon de Substrat (BCIP/NBT) <u>Prêt à l'emploi</u></p> <p><b>SUBS</b> <b>BCIP-NBT</b></p>	<p>18 ml</p>	<p>18 ml</p>
<p>Un flacon d'Amplificateur spécifique à l'isotype recherché <u>Prêt à l'emploi</u></p> <p><b>SOLN</b> <b>ENH</b></p>	<p>650µl</p>	<p>650µl</p>
<p>Un flacon de Tampon Phosphate-Tween concentré 10x <u>A reconstituer en eau distillé</u></p> <p><b>BUF</b> <b>WASH</b> <b>10x</b></p>	<p>30 ml</p>	<p>30 ml</p>
<p> Tubes de réaction (1,5ml)</p>	<p>125</p>	<p>125</p>
<p>Etiquettes autocollantes pour le rendu des résultats</p>	<p>25</p>	<p>25</p>

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision
- Chronomètre
- Eau distillée (reconstitution du PBS-Tween concentré)
- Papier absorbant (séchage des bandelettes)
- Portoir de 96 tubes de réaction (bmd, réf. HM 501)

## ÉCHANTILLONS

- Le test est à effectuer sur sérum.
- Éviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum, sinon congelés à -20°C.
- Afin de limiter toutes fixations non spécifiques, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

## STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les réactifs et les bandelettes doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Après la première ouverture, conserver les bandelettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

## PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

S'assurer que les bandelettes soient bien égouttées après chaque lavage.

Les réactifs en solutions (excepté le substrat) contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Les coffrets **CELIAC-DOT** ont été élaborés dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.

**CELIAC-DOT IgA et IgG** ont été optimisés pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

bmd propose un contrôle multiparamétrique (Immuno-Trol II, réf.: HM037) qui peut être testé en parallèle. Il renferme des anticorps humains dirigés contre l'une des 2 spécificités recherchées. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

## PRÉPARATION DU DOSAGE

Avant la manipulation, ramener tous les réactifs à température ambiante.

### 1. Préparation du Tampon de Dilution et de Lavage (TDL)

- Diluer le tampon Phosphate-Tween concentré au 1/10 en eau distillée.
- Durée de conservation : 3 mois entre +2°C et +8°C.

### 2. Préparation des échantillons

- Identifier une bandelette par échantillon.
- Identifier 4 tubes de réaction par échantillon. Les numéroter de 1 à 4 :
  - ≠ tube 1 : incubation de l'échantillon
  - ≠ tube 2 : incubation de l'activateur
  - ≠ tube 3 : incubation du conjugué
  - ≠ tube 4 : incubation du substrat
- Distribuer 600µl de tampon TDL dans les tubes 1, 2 et 3.
- Préparer un tube supplémentaire réservé aux 3 séries de lavages et contenant 600µl de tampon TDL.

### Remarques :

- ❖ *Le substrat est sensible à la lumière. Il nécessite d'être distribué au moment de son utilisation dans les tubes 4 extemporanément.*
- ❖ *Certaines conditions environnementales comme la température peuvent influencer le résultat final. Pour des températures > +30°C, il est recommandé d'être vigilant sur la cohérence des résultats obtenus.*
- ❖ *Certaines conditions opératoires peuvent influencer l'intensité de la couleur bleue et conduire à une atténuation de celle-ci lorsque :*
  - *le temps d'agitation à chaque lavage est inférieur à 1 minute*
  - *la membrane se colle à la paroi du tube durant les différentes incubations.*
  - *l'homogénéisation, en tampon, de l'échantillon et du conjugué est incomplète.*

## INTERPRÉTATION DES RESULTATS

### 1. Critères de Validation de la Manipulation :

- Le contrôle positif doit présenter un cercle de couleur bleue avec un contour nettement délimité.

### 2. Lecture des bandelettes :

Pour une interprétation aisée et fiable, vérifier que les bandelettes soient totalement sèches.

Pour chaque spécificité, interpréter selon le tableau ci-dessous :

ASPECTS DES PUIITS	RESULTATS
Aucun puits nettement cerclé	Absence d'autoanticorps NEGATIF
Présence d'un cercle distinct et bien délimité dont la coloration est nuancée du clair au sombre	Présence d'autoanticorps POSITIF

D'après l'évaluation interne des performances du coffret CELIAC DOT, les échantillons donnant un aspect négatif en DOT correspondent à un titre inférieur à 20 UA/ml avec les coffrets bmd GLIA-LISA et bmd FIDIS™ CELIAC.

*Tous puits présentant un cercle peu discernable, sans contour net, doit être contrôlé sur un second prélèvement quelques semaines plus tard et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.*

## CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

Spécificités	Glia	tTG	Glia	tTG
	IgG	IgG	IgA	IgA
Test de comparaison	Tests ELISA			
Population étudiée	* 72 échantillons provenant de patient testés positifs pour une ou plusieurs spécificités relatives à la maladie Coeliaque. * 104 échantillons provenant d'individus sains ou atteints d'autres maladies	* 71 échantillons provenant de patient testés positifs pour une ou plusieurs spécificités relatives à la maladie Coeliaque. * 104 échantillons provenant d'individus sains ou atteints d'autres maladies		
	Tout résultat discordant entre ces deux méthodes a été contrôlé à l'aide du coffret FIDIS™ CELIAC (réf.MX009 / MX010) commercialisé par bmd.			

### • Isotype IgG

Anti-Gliadine IgG			
176	ELISA		
	Positifs	57	15
	Négatifs	3	101
CELIAC-DOT	Positifs	57	15
	Négatifs	3	101

Anti-tTG IgG			
176	ELISA		
	Positifs	29	9
	Négatifs	1	137
CELIAC-DOT	Positifs	29	9
	Négatifs	1	137

### Anti-Gliadine IgG

### Anti-tTG IgG

#### Indices de la valeur diagnostique

Sensibilité relative : 95.0% (57/60)    Sensibilité relative : 96.7% (29/30)  
 Spécificité relative : 87.1% (101/116)    Spécificité relative : 93.8% (137/146)  
 Concordance : 89.8% (158/176)    Concordance : 94.3% (166/176)

#### Contrôle par FIDIS™ CELIAC IgG:

☞ 15 échantillons positifs en DOT et négatif en ELISA dont 12 confirmés positifs par FIDIS™ CELIAC.  
 ☞ 3 échantillons négatifs en DOT et positifs en ELISA, dont 2 confirmés négatifs par FIDIS™ CELIAC.

☞ 9 échantillons positifs en DOT et négatif en ELISA dont 3 confirmés positifs par FIDIS™ CELIAC.  
 ☞ 1 échantillon négatif en DOT et positifs en ELISA, dont non confirmé négatif par FIDIS™ CELIAC.

### • Isotype IgA

Anti-Gliadine IgA			
175	ELISA		
	Positifs	58	16
	Négatifs	1	100
CELIAC-DOT	Positifs	58	16
	Négatifs	1	100

Anti-tTG IgA			
175	ELISA		
	Positifs	57	3
	Négatifs	0	115
CELIAC-DOT	Positifs	57	3
	Négatifs	0	115

### Anti- Gliadine IgA

### Anti-tTG IgA

#### Indices de la valeur diagnostique

Sensibilité relative:98.3% (58/59)    Sensibilité relative: 100% (57/57)  
 Spécificité relative: 86.2% (100/116)    Spécificité relative: 97.5% (115/118)  
 Concordance: 90.3% (158/175)    Concordance: 98.3% (172/175)

#### Contrôle par FIDIS™ CELIAC IgA :

☞ 16 échantillons positifs en DOT et négatif en ELISA dont 5 confirmés positifs par FIDIS™ CELIAC.  
 ☞ 1 échantillon négatif en DOT et positif en ELISA, confirmé négatif par FIDIS™ CELIAC.

☞ 3 échantillons positifs en DOT et négatif en ELISA tous confirmés positifs par FIDIS™ CELIAC.

### LISTE DES SYMBOLES

	Référence produit
	Numéro de lot
	Nombre de tests
	Test unitaire
	Pour le diagnostic <i>in vitro</i> uniquement
	Date d'expiration
	Limites de température
	Lire les instructions d'utilisation
	Conforme à la réglementation CE
	A reconstituer ou diluer avec de l'eau
	Contient de l'azide de sodium
	Contient du Proclin

### BIBLIOGRAPHIE

**DIETERICH W et al**, Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med 1997; 3: 797-801

**FOTOUAKI M et al**, Clinical application of immunological markers as monitoring tests in celiac disease. Dig Dis Sci. 1999 Oct;44(10):2133-8.

**ANDRE C**, Anticorps et auto anticorps associés à la maladie coeliaque. Autoanticorps - Marqueurs des Maladies autoimmunes - bmd Editions 1999, 403-415.

**SARDY M et al**, Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Clin Chem. 1999 Dec;45 (12):2142-9.

**VITORIA JC. et al**, Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1999 Nov;29(5):571-4.

**WALTER-SMITH JA et al**, Working of European society of pediatric gastroenterology and nutrition (ESPGAN). Revised criteria for diagnosis of celiac disease Arch. Dis of Child 1990; 65: 909

**SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE**

	<b>OPERATIONS A EFFECTUER</b>	<b>TEMPS D'INCUBATION</b>
<b>INCUBATION DES SERUMS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajouter 20 µl d'échantillon dans le tube 1 contenant le tampon TDL.</li> <li>- Y plonger la bandelette identifiée.</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s).</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul>	20 minutes à T.A
Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µl d'activateur dans le tube 2 contenant le TDL		
<b>LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL.</li> <li>- Agiter* manuellement.</li> <li>- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant.</li> </ul>	1 minute à T.A
<b>AMPLIFICATION</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube 2</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s).</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul>	15 minutes à T.A
Pendant l'incubation des échantillons, distribuer 20µl de conjugué dans le tube 3 contenant le TDL		
<b>LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL.</li> <li>- Agiter* manuellement.</li> <li>- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant.</li> </ul>	1 minute à T.A
<b>INCUBATION DU CONJUGUE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube 3.</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s).</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul>	15 minutes à T.A
En fin d'incubation du conjugué, distribuer 600µl de substrat dans le tube 4		
<b>LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plonger la bandelette dans le tube de lavage contenant du TDL.</li> <li>- Agiter* manuellement.</li> <li>- Eliminer le tampon résiduel en égouttant la bandelette sur un papier absorbant.</li> </ul>	1 minute à T.A
<b>INCUBATION DU SUBSTRAT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Placer la bandelette dans le tube 4.</li> <li>- Déclencher le chronomètre.</li> <li>- Agiter* manuellement la bandelette 20 fois (sur une durée totale de 15s).</li> <li>- Laisser ensuite incuber <u>sans agiter</u>.</li> </ul>	5 minutes à T.A
<b>LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laver la bandelette sous l'eau du robinet.</li> </ul>	
<b>SECHAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eliminer l'eau résiduelle en déposant la bandelette sur un papier absorbant et <b>laisser sécher complètement</b> avant l'interprétation du résultat.</li> </ul>	environ 30 minutes à T.A

T.A : Température Ambiante entre +18°C et + 25°C.

\*: Les agitations doivent être lentes et verticales.

**BioMédical Diagnostics SA**



**Siège social**

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tél : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)

# CELIAC-DOT

**REF** HM 047 IgG



**REF** HM 048 IgA



English

## DEFINITION

The **CELIAC-DOT** kit is a qualitative enzyme immunoassay (EIA) based on membrane assay strip for autoantibodies detection.

- ↳ **CELIAC-DOT IgA** is designed for the simultaneous detection of human IgA isotype autoantibodies directed against Gliadin and Tissue Transglutaminase Enzyme.
- ↳ **CELIAC-DOT IgG** is designed for the detection of human IgG isotype autoantibodies directed against Gliadin and Tissue Transglutaminase Enzyme.

## DIAGNOSTIC VALUE

Coeliac disease is an absorption deficiency syndrome characterized by weight loss, abdominal pain, and dietary gluten intolerance. Many affected patients have antibodies directed against gliadin (anti-gliadin), endomysium/tissue transglutaminase (anti-tTG) and reticulin (anti-reticulin). Anti-reticulin antibodies may be considered to be less sensitive than anti-gliadin in the assessment of patients with celiac disease. The detection of these antibodies is valuable in identifying patients with celiac disease, and to assure appropriate treatment and follow-up

Anti-gliadin antibodies (IgA and IgG) appear to be less specific than anti-endomysium or anti-tTG antibodies. Nevertheless, they may offer a benefit when assessing children under two years of age since affected persons in this age group may develop IgA anti-gliadin before developing IgA anti-endomysium. Anti-gliadin IgG may also be important for use in patients with celiac disease who also suffer from a variety of IgA deficiencies. After several months of treatment with a gluten free diet, antibody titers frequently decrease; though antibody levels may increase again on discontinuation of the gluten free diet.

The combined anti-gliadin and anti-tTG assay offers adult and children patients an easy, rapid, sensitive and specific technique for the detection and the treatment follow-up of Coeliac disease.

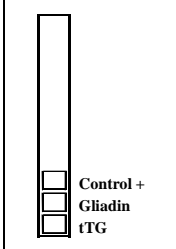
- \* The simultaneous presence of IgA anti-gliadin and anti-tTG antibodies, with or without IgG antibodies, will enable to confirm the quasi evidence of a celiac disease diagnosis. It is also an indication that a duodenojejunal biopsy should be performed.
- \* With reference made to the patient clinical data, the presence of IgA and IgG anti-gliadin antibodies can in some cases confirm the diagnosis of celiac disease.
- \* IgG anti-tTG antibodies are highly reliable marker of Coeliac Disease in IgA deficient subjects.
- \* The presence of IgG anti-gliadin antibodies alone is not indicative of a celiac disease, nevertheless, it is recommended to take into account an eventual IgA deficiency.

## ASSAY PRINCIPLE

The antigens are coated on distinct membranes on the assay strip.

- First, the assay strip is incubated in a reaction tube containing the diluted sample of the patient. If this sample contains at least one of the antibodies, these antibodies will recognize and bind to the corresponding antigen. After incubation, a first wash step removes all of the unbound proteins.
- Second step, the assay strip is incubated in a reaction tube containing the enhancer. After incubation, a wash step removes all of the unbound enhancer.
- An alkaline phosphatase labeled to the conjugate binds to the captured antibodies. The excess of unbound conjugate is removed by a third wash step.
- The bound conjugate is visualized with an insoluble substrate for the phosphatase enzyme (BCIP/NBT). This will result into a blue colored spot, confirming the presence of autoantibodies in the sample tested.

## REAGENTS

	HM047	HM048
Assay strips		
	Antigens coated : Purified Gliadin and recombinant human tissue transglutaminase( tTG)	25
1 vial of IgA-PAL Conjugate (Phosphatase alkanin labeled IgA) To be diluted	CONJ   IgA	650 µL
1 vial of IgG-PAL Conjugate (Phosphatase alkanin labeled IgG) To be diluted	CONJ   IgG	650 µL
1 vial of Substrate (BCIP/NBT) Ready to use	SUBS   BCIP-NBT	18 mL
1 vial of Enhancer corresponding for each isotype detection Ready to use	SOLN   ENH	650 µL
1 vial of Phosphate-Tween buffer (concentrate 10x) To be diluted in distilled water	BUF   WASH   10x	30 mL
Reaction tubes (1,5mL)	125	125
Self-stick labels for returned results	25	25

## MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Pipettes
- Timer
- Distilled water (to dilute the concentrated Phosphate-Tween buffer)
- Adsorbent towels (to blot dry the assay strip)
- Support for 96 microtubes (bmd, cat. HM501)

## SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The tests are performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

## STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and assay strips at +2°C/+8°C in their own package.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- Store unused strips into their plastic bag with the desiccant.
- Store all components immediately after use again at +2°C/+8°C.

## PRECAUTIONS

Be sure that the strips are dry after each wash.

Reagents in solution (except for substrate buffer) contain less of 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.

**CELIAC-DOT** kits have been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

**CELIAC-DOT IgG and IgA** have been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute other manufacture's reagents. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

## QUALITY CONTROL

bmd offers a multiparametric quality control (Immunotrol II, Cat. No: HM037) which contains antibodies directed against one of both specificities; it must be handled in the same way as samples.

## SETUP

All reagents must be at room temperature before use.

### 1. Preparation of the wash and dilution buffer

- Dilute 10 times the concentrated Phosphate-Tween buffer in distilled water.
- Storage period: 3 months at +2°C/+8°C

### 2. Preparation of samples

- Mark one strip per sample.
- Mark 4 reaction tubes per sample and number from 1 to 4:
  - ≠ tube 1: sample incubation.
  - ≠ tube 2: enhancer incubation.
  - ≠ tube 3: conjugate incubation.
  - ≠ tube 4: substrate incubation
- Dispense 600µL of wash and dilution buffer in tubes 1, 2 and 3.
- Mark an other microtube reserved for the three first washing steps and dispenses 600µL of wash and dilution buffer.

### Remarks and precautions:

- ❖ *The substrate is light sensitive. It requires to be dispense immediately at the time of his use in the tubes 4.*
- ❖ *Certain environmental conditions as the temperature may influence the final result. For temperatures > +30°C, it is recommended to be vigilant on the coherence of the results obtained.*
- ❖ *Certain operational conditions may influence the intensity of the blue color and should therefore be avoided:*
  - *the agitation time in each wash step is less than a minute*
  - *the membrane sticking to the wall of the vessel during incubation steps.*
  - *incomplete mixing of sample and conjugate*

## INTERPRETATION OF RESULTS

### 1. Validation criterion for the manipulation:

- The positive control should give a blue colored circle with a well defined outline.

### 2. Reading of the strips:

In order to interpret correctly make sure that the strips are completely dry.

For each specificity interpret this scheme:

APPEARANCE OF THE WELL	RESULTS
no circle	absence of auto-antibodies NEGATIVE
presence of a circle of which the staining is variable from bright to dark	presence of auto-antibodies POSITIVE

According to the CELIAC DOT evaluation of performances, samples giving a negative dot pattern correspond to titles lower than 20AU/mL with bmd GLIA-LISA and FIDIS™ CELIAC.

*Each membrane showing a difficult to distinguish circle should be controlled with a second blood sample, drawn a few weeks later. The interpretation of the results should be done in relation to other examinations and in the clinical context.*

**CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST**

Specificities	Glia	tTG	Glia	tTG
	IgG	IgG	IgA	IgA
Predicate test	ELISA tests			
Population evaluated	* 72 positive samples for one or more parameters related to Coeliac Disease. * 104 samples of healthy individuals and patients suffering of other diseases.		* 71 positive samples for one or more parameters related to Coeliac Disease. * 104 samples of healthy individuals and patients suffering of other diseases.	
	All the discordant results between the two methods are been controlled by FIDIS™ CELIAC (ref. MX009 / MX010) commercialised by bmd.			

**IgG Isotype**

Anti-Gliadin IgG			
176		ELISA	
		Positive	Negative
CELIAC-DOT	Positive	57	15
	Negative	3	101

Anti-tTG IgG			
176		ELISA	
		Positive	Negative
CELIAC-DOT	Positive	29	9
	Negative	1	137

**Anti-Gliadin IgG**

**Anti-tTG IgG**

*Indication of the diagnostic value*

Relative sensitivity: 95.0% (57/60)      Relative sensitivity: 96.7% (29/30)  
 Relative specific affinity: 87.1% (101/116)      Relative specific affinity: 93.8% (137/146)  
 Concordance: 89.8% (158/176)      Concordance: 94.3% (166/176)

*Controlled by FIDIS™ CELIAC IgG*

<p>↪ 15 samples positive on the DOT and negative by ELISA, 12 are positive with FIDIS™ CELIAC.</p> <p>↪ 3 samples negative on the DOT and positive by ELISA, 2 are negative with FIDIS™ CELIAC.</p>	<p>↪ 9 samples positive on the DOT and negative by ELISA, 3 are positive with FIDIS™ CELIAC.</p> <p>↪ 1 sample negative on the DOT and positive by ELISA, and positive with FIDIS™ CELIAC.</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Isotype IgA**

Anti-Gliadin IgA			
175		ELISA	
		Positive	Negative
CELIAC-DOT	Positive	58	16
	Negative	1	100

Anti-tTG IgA			
175		ELISA	
		Positive	Negative
CELIAC-DOT	Positive	57	3
	Negative	0	115

**Anti- Gliadin IgA**

**Anti-tTG IgA**

*Indication of the diagnostic value*

Relative sensitivity: 98.3% (58/59)      Relative sensitivity: 100% (57/57)  
 Relative specific affinity: 86.2% (100/116)      Relative specific affinity: 97.5% (115/118)  
 Concordance: 90.3% (158/175)      Concordance: 98.3% (172/175)

*Controlled by FIDIS™ CELIAC IgG:*

<p>↪ 16 samples positive on the DOT and negative by ELISA, 5 are positive with FIDIS™ CELIAC.</p> <p>↪ 1 sample negative on the DOT and positive by ELISA, and negative with FIDIS™ CELIAC.</p>	<p>↪ 3 samples positive on the DOT and negative by ELISA, all are positive with FIDIS™ CELIAC.</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

**SYMBOLS USED**

	Catalog number
	Batch code
	Number of tests
	Rapid test
	In vitro diagnostic device
	Use by
	Storage temperature limitation
	Read instructions for use
	EC Declaration of Conformity
	Reconstitute with water
	Contains sodium azide
	Contains Proclin

**BIBLIOGRAPHY**

**DIETERICH W et al**, Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med 1997; 3: 797-801

**FOTOULAKI M et al**, Clinical application of immunological markers as monitoring tests in celiac disease. Dig Dis Sci. 1999 Oct;44(10):2133-8.

**ANDRE C**, Anticorps et auto anticorps associés à la maladie coeliaque. Autoanticorps - Marqueurs des Maladies autoimmunes - bmd Editions 1999, 403-415.

**SARDY M et al**, Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Clin Chem. 1999 Dec;45 (12):2142-9.

**VITORIA JC. et al**, Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1999 Nov;29(5):571-4.

**WALTER-SMITH JA et al**, Working of European society of pediatric gastroenterology and nutrition (ESPGAN). Revised criteria for diagnosis of celiac disease Arch. Dis of Child 1990; 65: 909

## SUMMARY OF METHOD

	OPERATIONS STEPS	INCUBATION TIME
<b>INCUBATION OF SAMPLES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Add 20µL sample to tube 1 containing wash and dilution buffer.</li> <li>- Put in the identified strip.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul>	20 minutes at R.T
During sample incubation, add 20µL enhancer to tube 2 containing wash and dilution buffer		
<b>WASH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer.</li> <li>- Move* manually.</li> <li>- Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel.</li> </ul>	1 minute at R.T
<b>ENHANCER</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in tube 2.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul>	15 minutes at R.T
During sample incubation, add 20µL conjugate to tube 3 containing wash and dilution buffer		
<b>WASH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer.</li> <li>- Move* manually.</li> <li>- Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel.</li> </ul>	1 minute at R.T
<b>INCUBATION OF CONJUGATE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in tube 3.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul>	15 minutes at R.T
At the end of the conjugate incubation, dispense 600µL of substrate in tube 4		
<b>WASH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in the corresponding wash tube with wash and dilution buffer.</li> <li>- Move* manually.</li> <li>- Take the strip out of the tube and remove residual buffer by blotting the strip with an adsorbent towel.</li> </ul>	1 minute at R.T
<b>INCUBATION OF SUBSTRATE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Put the strip in tube 4.</li> <li>- Start the alarm.</li> <li>- Move* the strip manually 20 times up and down (during 15s)</li> <li>- Then incubate <u>without shaking</u>.</li> </ul>	5 minutes at R.T
<b>WASH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wash the strip under tap water.</li> </ul>	
<b>DRY</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Remove water by blotting the strip with an adsorbent towel and <b>let dry completely</b> before reading the result.</li> </ul>	about 30 minutes at R.T

R.T : Room Temperature between +18°C and + 25°C.

\* : Up and down agitations should be slow.

**BioMédical Diagnostics SA**

**Office**  
Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tel : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)

