



(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 33012 B1

(51) Cl. internationale :
G01N 33/50

(43) Date de publication :
01.02.2012

(21) N° Dépôt :
32998

(22) Date de Dépôt :
07.07.2010

(71) Demandeur(s) :
**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH, Route d'Imouzzer B.P.2626 FES
30000 (MA)**

(72) Inventeur(s) :
LOTFI AARAB ; IBTISSAM OUAHIDI

(54) Titre : **TROUSSE DE DETECTION D'IgE ET D'IgG HUMAINES ANTI-GLIADINES**

(57) Abrégé : CE BREVET DÉCRIT UNE TROUSSE ANALYTIQUE DE RÉVÉLATION CHEZ L'HOMME DE LA PRÉSENCE D'ANTICORPS DE TYPE IGE ET IGG ANTI-GLIADINE. C'EST UNE TROUSSE QUALITATIVE POUR LA DÉTECTION DES IGE SPÉCIFIQUES ANTI-GLIADINES AU PROFIT DES ALLERGIQUES À LA FARINE DE BLÉ, ET AUSSI LA DÉTECTION DES IGG SPÉCIFIQUE ANTI-GLIADINE EN FAVEUR DES MALADES COELIAQUES. IL S'AGIT D'UN TEST IMMUNOENZYMATIQUE RAPIDE (DURÉE 2,5H) DONT L'UTILISATION PERMET DE CONFIRMER LA SENSIBILITÉ DES PATIENTS À LA GLIADINE. LE TEST EST BASÉ SUR UNE RÉACTION ANTICORPS-ANTIGÈNE. LES GLIADINES SONT FIXÉES AUX PUIITS. CES PROTÉINES VONT ÊTRE RECONNUES PAR LES SÉRUMS HUMAINS. CES COMPLEXES "PROTÉINES-ANTICORPS" SONT RÉVÉLÉS PAR DES ANTICORPS ANTI-IGE OU ANTI-IGG HUMAINS MARQUÉS À LA PEROXYDASE. LA RÉVÉLATION EST RÉALISÉE PAR L'ADDITION DE L'OPD (O-PHENYLENDIAMINE) QUI DONNE UNE COLORATION DONT L'INTENSITÉ EST PROPORTIONNELLE À LA FIXATION DES ANTICORPS.

Abrégé

Ce brevet décrit une trousse analytique de révélation chez l'Homme de la présence d'anticorps de type IgE et IgG anti-gliadine. C'est une trousse qualitative pour la détection des IgE spécifiques anti-gliadines au profit des allergiques à la farine de blé, et aussi la détection des IgG spécifique anti-gliadine en faveur des malades coeliaques. Il s'agit d'un test immunoenzymatique rapide (durée 2,5h) dont l'utilisation permet de confirmer la sensibilité des patients à la gliadine.

Le test est basé sur une réaction anticorps-antigène. Les gliadines sont fixées aux puits. Ces protéines vont être reconnues par les sérums humains. Ces complexes « Protéines-Anticorps » sont révélés par des anticorps anti-IgE ou anti-IgG humains marqués à la peroxydase. La révélation est réalisée par l'addition de l'OPD (O-Phenylenediamine) qui donne une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la fixation des anticorps.

3 Matériel et réactifs utiles

a- Matériel fourni

Dans chaque trousse sont fournies deux plaques pour la révélation des IgE et des IgG anti-gliadines.

Plaque IgE

- 2 Plaques de Microtitration avec 96 puits pre-coated avec les gliadines. Ceci suivi d'une saturation par BSA.
- Solution1 « N » des contrôles négatifs (BBS seul sans anticorps) 5ml
- Solution2 « P » des contrôles positifs (contenant des IgE spécifiques) 5ml
- Solution3 « Conjugate » contenant les anti-IgE humain conjugués à la peroxydase 15 ml
- Solution4 « Substrat » de la peroxydase 15 ml
- Solution5 « arrêt » 15 ml
- Solution6 « lavage » 300 ml
- Solution7 « dilution » des sérums

Plaque IgG

- 2 Plaques de Microtitration avec 96 puits pre-coated avec les gliadines. Ceci suivi d'une saturation par BSA.
- Solution1 « N » des contrôles négatifs (BBS seul sans anticorps) 5ml
- Solution2 « P » des contrôles positifs (contenant des IgG spécifiques) 5ml
- Solution3 « Conjugate » contenant les anti-IgG humain conjugués à la peroxydase 15 ml
- Solution4 « Substrat » de la peroxydase 15 ml
- Solution5 « arrêt » 15 ml
- Solution6 « lavage » 300 ml
- Solution7 « dilution » des sérums

CN													
CP													
E													
E													
E													
E													
E													
E													

CN : Contrôle négatif; CP : Contrôle positif ; E : Echantillons

b- Matériel nécessaire non Fourni

Equipement

- Pipettes et micropipettes

Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

c- Précaution d'utilisation et stockage

- La solution d'arrêt contient de l'acide chlorhydrique, des précautions doivent être prises pour éviter des accidents
- Ne pas utiliser les produits du kit au-delà du délai d'expiration
- Ne pas procéder à des dilutions non recommandées des réactifs ce qui va diminuer la sensibilité du test
- Le kit doit être stocké à moins de 7°C
- Le substrat est sensible à la lumière. Au cours de son utilisation, gardez-le loin de toute source de lumière
- Toute coloration du substrat indique une détérioration de la solution qu'il est nécessaire de remplacer.

4- Méthode

Les sérums humains sont déposés après dilution (dans la solution 7, au minimum 1/3) dans la plaque. Ces sérums sont mis en contact avec les allergènes immobilisés pendant une heure à 37°C (100 µl par puits).

En parallèle, 100 µl par puits de la solution 1 et de la solution 2 sont déposées respectivement dans les puits des contrôles négatifs et positifs.

Après le lavage de la plaque (trois lavages avec solution de lavage), l'anticorps monoclonal anti-IgE humain marqué à la peroxydase est incubé (100 µl par puits de la solution 3) pendant une heure à 37°C. Un autre lavage est effectué avant d'ajouter le substrat (solution 4, OPD, 100 µl).

La réaction se développe à l'abri de la lumière à 37°C pendant 10 à 20 minutes. Elle est arrêtée par l'ajout de 50 µl de la solution d'arrêt (solution 5).

La lecture des résultats est faite par comparaison avec les témoins négatifs et positifs réalisés en parallèle.

5- Réalisation du test

	Contrôle négatif	
	Solution1 100 µl	
Incubation à 37°C, 1 heure		
Lavage		
Solution3	100 µl	
Incubation à 37°C, 1 heure		
Lavage		
Solution4	100 µl	
Incubation à 37°C, 10-15 min		
Solution5	50 µl	

	Echantillon
Sérum à tester	100 µl
Incubation à 37°C, 1 heure	
Lavage	
Solution3	100 µl
Incubation à 37°C, 1 heure	
Lavage	
Solution4	100 µl
Incubation à 37°C, 10-15 min	
Solution5	50 µl

6- Expression des résultats

- ✓ Si coloration égale ou plus intense que le contrôle positif ceci indique une réaction positive.
- ✓ Si absence de coloration ou intensité inférieure au contrôle positif ceci indique une réaction négative.
- ✓ En cas de doute, il est préférable de refaire le test.

Revendications

- 1- La trousse analytique permet de détecter les IgE et IgG des patients anti-gliadines natives.
- 2- Les gliadines détectables par la trousse correspondent à des protéines isolées de céréales couramment et spécifiquement consommées par les Marocains.
- 3- Le principe de détection de la trousse repose sur une réaction immunoenzymatique médiée par la peroxydase.
- 4- La trousse analytique Selon (1), est caractérisée en ce qu'elle permet la réalisation de plusieurs tests sur plusieurs personnes
- 5- La trousse analytique Selon (1), est caractérisée en ce qu'elle permet la réalisation de test sur une seule personne et son suivi
- 6- La trousse analytique Selon (1), est caractérisée en ce qu'elle permet la réalisation du test chez l'Homme.
- 7- La trousse analytique Selon (2) est caractérisée par ce que le test détecte la sensibilité au gluten du blé dur.
- 8- La trousse analytique Selon (4, 5, 6) est définit en ce que le test soit utilisé pour l'analyse qualitative
- 9- La trousse analytique Selon (4, 5, 6) est définit selon que le test soit utilisé pour le suivi de l'évolution des allergiques à la farine de blé et des malades cœliaques.
- 10- La trousse analytique Selon (2, 3, 4) est définit selon que le test soit utilisé pour l'évaluation de l'efficacité des traitements.