

CARDIO-LISA IgM

REF HM 006



DÉFINITION

Le coffret **CARDIOLISA IgM** (BMD) permet le dosage des autoanticorps anti-cardiolipine dans le sérum ou le plasma humain par une méthode immunoenzymatique.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les autoanticorps anti-cardiolipine sont présents dans des circonstances cliniques comparables à celles des anticoagulants de type lupique (anti-prothrombinase) et sont d'ailleurs fréquemment associés à ces derniers. De plus, il n'est pas rare de trouver chez ces patients une sérologie syphilitique dissociée avec un VDRL positif et un TPHA négatif. Les maladies les plus fréquemment associées sont le lupus érythémateux disséminé, le lupus induit médicamenteux, la maladie thrombo-embolique et les thromboses en général, les avortements à répétition, les cytopénies périphériques autoimmunes, la cirrhose biliaire primitive, certaines infections aiguës, les infections par rétrovirus, SIDA et HTLV. Les anticorps anti-cardiolipine, à l'exception des infections où leur présence est d'ailleurs transitoire, semblent avoir une valeur prédictive pour les thromboses. Ils aggravent le pronostic vital dans l'infarctus du myocarde et augmentent le risque de rejet du greffon pour le bypass. Le terme de "syndrome des anticorps anti-cardiolipine" a été proposé pour désigner les manifestations morbides associées à ces anticorps. Les anticorps anti-cardiolipine sont habituellement de classe IgG, IgG et IgM ou IgG et IgA.

Indications pour le dépistage des anticorps anti-cardiolipine

Celles-ci seront essentiellement à visée diagnostique et pronostique. Les principales indications cliniques sont :

- les thromboses
- le lupus érythémateux disséminé
- le lupus induit médicamenteux
- le lupus hématologique avec anti-mitochondrie type 5
- le syndrome de Soulier et Boffa
- les avortements à répétition.

Sur le plan biologique :

- un anticoagulant de type lupique (anti-prothrombinase) confirmé ou suspecté devant un allongement du temps de céphaline activé.
- une sérologie syphilitique dissociée avec un VDRL positif et un TPHA négatif
- des anticorps anti-mitochondries type 1 ou type 5.
- les cytopénies périphériques et en particulier les thrombopénies associées aux maladies autoimmunes.

Des anticorps anti-cardiolipine, un anticoagulant de type lupique, une sérologie syphilitique dissociée, un anti-mitochondries type 5 et un test de Coombs positif peuvent s'associer chez un même malade, mais cela est plutôt rare.

En revanche les cas avec un seul ou deux anticorps sont fréquents et c'est la raison pour laquelle ces anticorps doivent être recherchés individuellement, l'absence de l'un, n'excluant pas la présence de l'autre. On a tenté d'expliquer leur association, par l'immunisation contre un ou plusieurs phospholipides communs aux tests servant à les dépister.

Une alternative postule l'existence d'anticorps avec réactivité croisée pour plusieurs phospholipides. Des anticorps monoclonaux humains donnant des réactions croisées entre ADN, cardiolipine et autres phospholipides ont été décrits (Schoenfeld et col. 1983), ce type d'anticorps serait dirigé contre la liaison phosphodiester.

Les anticorps anti-cardiolipine peuvent exister chez des sujets normaux. Leur taux est faible et ils sont souvent transitoires. Leur signification est inconnue.

PRINCIPE DU TEST

L'antigène Cardiolipine (diphosphatidylglycérol) est adsorbé sur un support solide constitué de 6 barrettes de 8 micropuits en plastique.

- Dans un premier temps, l'échantillon dilué est distribué dans un puits. S'il contient les anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer sur l'antigène. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.
- On ajoute ensuite un conjugué anti-IgM humaine couplé à la phosphatase alcaline qui se fixe au complexe Antigène-Anticorps précédemment formé. Après incubation, l'excès de conjugué est éliminé par un second lavage.
- L'étape de chromogénèse est réalisée en déposant le substrat de l'enzyme (Para Nitro Phenyl Phosphate). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-cardiolipine présents dans l'échantillon.
- L'addition de NaOH 1N permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 405 nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.

Une gamme d'étalonnage constituée de 4 étalons titrés en unités internationales MPL (définies par Harris et Col) permet, par interpolation, de définir le titre du sérum patient.

ECHANTILLONS

- Le test peut être réalisé avec des sérums ou plasmas non décomplémentés.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus de 1 fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 7 jours maximum, sinon congelé s.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs et les barrettes de puits sensibilisées 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 barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

COMPOSITION DES COFFRETS

| | HM006 |
|--|--------------|
| Une plaque munie de barrettes amovibles sécables puits par puits recouverts d'antigène cardioline (diphosphatidylglycerol). MP | 12 barrettes |
| Quatre flacons d'étalons titrés en unités MPL <u>Prêts à l'emploi</u> <i>Les titres sont indiqués sur l'étiquette des flacons.</i> CAL n | 4 x 1,5ml |
| Un flacon de contrôle positif <u>A diluer</u> <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i> CONTROL + | 350µl |
| Un flacon de contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL - | 350µl |
| Un flacon de conjugué couplé à la phosphatase alcaline <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ IgM | 15ml |
| Un flacon de substrat contenant 6 comprimés de 5 mg de PNPP <u>A dissoudre</u> SUBS PNPP | 1 |
| Un flacon de tampon Phosphate pH 7.2 concentré 10 fois <u>A reconstituer en eau distillé</u> BUF WASH 10x | 100ml |
| Un flacon de tampon de dilution substrat <u>Prêt à l'emploi</u> BUF SUBS | 35ml |
| Un flacon de tampon de dilution et de lavage : solution A <u>A diluer</u> BUF Sol.A | 15ml |
| Un flacon de solution NaOH 1N <u>Prêt à l'emploi</u> SOLN STOP | 9ml |

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Agitateur
- Etuve à +37°C
- Sérum physiologique (NaCl 0,9 %)
- Lecteur muni d'un filtre 405 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

1. Tampon phosphate

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

Remarque : En présence de cristaux dans la solution concentrée, placer le flacon 15min à 37°C avant utilisation.

2. Tampon de lavage

- Diluer la solution A au 1/100 en tampon phosphate.

3. Tampon de dilution (Solution D)

- Diluer la solution A au 1/10 en tampon phosphate. Cela constitue la solution tampon de dilution.

4. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer au 1/50 dans le tampon de dilution (Solution D)
Ex : 10µl d'échantillons qsp 500µl de tampon de dilution D, agiter vigoureusement au vortex.

5. Utilisation du conjugué prêt à l'emploi :

- Estimer le volume nécessaire à la manipulation et le transférer dans un tube à partir duquel se fera le dépôt.

6. Préparation du substrat

- Dissoudre les tablettes de PNPP dans le tampon de dilution substrat (1 tablette dans 5ml de tampon)
- A préparer extemporanément. Conserver à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Ramener tous les réactifs à température ambiante (18 - 25°C) avant la manipulation. S'assurer que les plaques soient bien égouttées après chaque lavage. Eviter de superposer les plaques lors de l'incubation à 37°C en chambre humide. S'assurer qu'il ne reste pas d'eau de condensation à la base des puits avant lecture au spectrophotomètre.

Les étalons et les contrôles sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

Les réactifs en solution (excepté le tampon substrat et la solution d'arrêt) contiennent de l'azide de sodium comme agent de conservation, à une concentration <0.1% (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.

Le coffret **CARDIO-LISA IgM** a été élaboré 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.

CARDIO-LISA IgM a été optimisé 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.

MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

Prévoir :

- un puits « blanc réactif » constitué par du tampon de dilution (solution D)
- 2x4 puits pour les étalons (dépôt en double)
- 2x1 puits pour chaque contrôle (dépôt en double)
- Pour une meilleure précision des résultats il est recommandé de déposer également les échantillons en double
- Extraire ensuite le nombre exact de puits nécessaires et les disposer sur le support plastique.

2. Incubation des contrôles et des échantillons

Déposer 100µl d'étalons, contrôles ou échantillons dilués.

Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de lavage (200µl/puits).

3. Incubation du Conjugué

Déposer 100µl de conjugué dans tous les puits

Incuber 30 minutes à température ambiante.

Vider les puits par retournement de la plaque.

Laver 3 fois avec le tampon de lavage (200µl par puits).

Laver 1 fois avec du NaCl 0.9% (200µl par puits).

4. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans chaque puits.

Incuber 30 minutes à 37°C en chambre humide.

5. Fixateur

Rajouter 50µl de NaOH (1N) dans chaque puits.

6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un spectrophotomètre muni d'un filtre 405 nm au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

Faire le zéro de l'appareil sur le puits "blanc réactif".

RÉSULTATS

Étalonnage en 4 points

Tracer la courbe d'étalonnage sur du papier logarithmique en portant en abscisses (axe des X) les unités des points étalons et en ordonnées (axe des Y) les DO correspondantes.

Remarques :

- La DO moyenne du standard 4 doit être au moins égale à 0.8
- Tous les prélèvements dont la DO est supérieure au point le plus élevé de la courbe sont à tester dilués au 1/200. Le nombre d'unités obtenu sera alors à multiplier par 4.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

| Unités MPL | < 10 | 10-15 | > 15 |
|------------|---------|---------------------|---------|
| Résultats | Négatif | Faiblement Positif* | Positif |

* : Les résultats faiblement positifs doivent être contrôlés sur un second prélèvement quelques semaines plus tard et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le coffret contient un contrôle positif et un contrôle négatif. Il est conseillé de les doser dans chaque série réalisée. Les valeurs obtenues pour le contrôle positif doivent être comprises dans l'intervalle des valeurs précisées sur l'étiquette du flacon. Si les résultats des contrôles ne sont pas conformes aux résultats attendus, les essais doivent être répétés.

bmd propose, en complément, un contrôle multiparamétrique (Immuno-Trol II, réf.: HM037) qui peut être testé en parallèle. Il renferme des anticorps anti-cardiolipines. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.













BIBLIOGRAPHIE

- ABUAF N. et al.
Vers une standardisation du dosage des anticorps anti-cardiolipine.
STV 1993, 5 : 663-671
- BEVER E.M.
Cofacteurs involved in the antiphospholipid syndrome.
Editorial.
Lupus 1992, 1 : 51-53
- FONT J.
Anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases : isotype distribution and clinical associations.
Clin. Rheum. 1989, 8 : 475-785
- HESS D.C.
Anticardiolipin antibodies : a study of frequency in TIA and stroke.
Neurology 1991, 23 (suppl) : 129-132
- INFANTE RIVARD C. et al.
Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and fetal loss. A case control study.
N. Engl. J. Med. 1991, 325 : 1063-1066
- LARAKI R.
Le syndrome des antiphospholipides
STV 1991, 325 : 363-369
- MEYER O., ROUQUETTE A-M et YOUINOU P.
Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes. BMD Editions (1999).

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

| | QUANTITÉ À DISTRIBUER | REACTIFS | CONDITIONS D'INCUBATIONS |
|----------------------|---|------------------------------------|---------------------------------|
| INCUBATION | 100µl | Solution D : puits blanc réactif | 30 mn à température ambiante |
| | 100µl | Étalons : puits étalon (en double) | |
| | 100µl | Contrôles dilués (en double) | |
| | 100µl | Echantillons dilués | |
| LAVAGE | Laver 3 fois en tampon de lavage (200µl/puits) | | |
| ETAPE DU CONJUGUÉ | 100µl | Conjugué anti-IgM humaine-PAL | 30 mn à température ambiante |
| LAVAGE | Laver 3 fois en tampon de lavage (200µl/puits) Laver 1 fois en NaCl 0,9% (200µl/puits) | | |
| RÉACTION ENZYMATIQUE | 100µl | Solution substrat | 30 mn à +37°C en chambre humide |
| ARRÊT DE LA RÉACTION | 50µl | NaOH 1N Solution d'arrêt | |

INDEX DES SYMBOLES

| | | | |
|---|--|---|--|
|  | Déclaration de conformité CE |  | Nombre de tests |
|  | Test ELISA |  | Consulter les instructions d'utilisation |
|  | Dispositif de Diagnostic <i>In Vitro</i> |  | Limites de température |
|  | Référence produit |  | Risque biologique |
|  | Numéro de Lot |  | Contient de l'azide de sodium |
|  | Date d'expiration |  | A reconstituer |

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
Internet : www.bmd-net.com



CARDIO-LISA IgM

REF HM 006



DEFINITION

CARDIO-LISA IgM (BMD) is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of anti-cardiolipin antibodies in human serum or plasma samples.

DIAGNOSTIC VALUE

Anti-cardiolipin autoantibodies are present in clinical contexts comparable to those in which lupus anticoagulants (anti-prothrombinase) are found. Moreover, they are frequently associated. In such patients, it is not rare to observe a dissociated syphilitic serology with positive VDRL and negative TPHA. The most frequent associated diseases are Disseminated Lupus Erythematosus, drug-induced lupus, thromboembolic disease and thrombosis in general, recurrent abortion, autoimmune peripheral cytopenia, primary biliary cirrhosis, certain acute infections and HIV and HTLV retrovirus infections. With the exception of infections, in which anti-cardiolipin antibodies seem only transiently present, the antibodies would seem to have a predictive value with respect to thrombosis. They exacerbate the life threat in myocardial infarction and enhance the risk of graft rejection following bypass procedures. The term, "anti-cardiolipin antibody syndrome" has been suggested to designate the morbid signs and symptoms that are associated with the presence of the antibodies. Anti-cardiolipin antibodies are generally of classes IgG, IgG and IgA.

Indications for screening of anti-cardiolipin antibodies

The indications are mainly diagnostic and prognostic. The main clinical indications are:

- Thrombosis
- Disseminated Lupus Erythematosus
- Drug-induced lupus
- Hematological lupus with anti-mitochondrial antibodies, type 5
- Soulier-Boffa syndrome
- Recurrent abortion

At biological level:

- A lupus anticoagulant (anti-prothrombinase) confirmed or expected in the context of an increased activated partial thromboplastin time (APTT)
- A dissociated syphilitic serology: VDRL positive and TPHA negative
- Anti-mitochondrial antibodies of types 1 or 5
- Peripheral cytopenia, particularly that associated with autoimmune disease.

Anti-cardiolipin antibodies, lupus anticoagulant, dissociated syphilitic serology, type 5 anti-mitochondrial antibodies and a positive Coombs' test result may be associated in the same patient, but that is rather rare.

In contrast, cases in which only one or two antibodies are present are relatively frequent. For that reason, screening for antibodies must be conducted individually, since the absence of one does not necessarily exclude the presence of the other. An attempt has been made to explain their association as immunization against one or several phospholipids common to the screening tests.

An alternative hypothesis is that antibodies with cross-reactivity to several phospholipids are involved. Human monoclonal antibodies yielding cross-reactions with DNA, cardiolipin and other phospholipids have been reported (Schoenfeld et al., 1983). That type of antibody is reported to be directed against the phosphodiester bond.

Anti-cardiolipin antibodies may be present in normal subjects. If that is the case, they are present at low levels and, frequently, transiently. Their significance is unknown.

ASSAY PRINCIPLE

Cardiolipin (diphosphatidylglycerol) is coated onto a polystyrene microtiter plate (6 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antigen coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Binding of anti-cardiolipin antibodies is detected using an anti-human IgM alkaline phosphatase labeled conjugate. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.
- The bound enzyme is revealed by addition of substrate (Para Nitro Phenyl Phosphate, producing a yellow colour. The colour intensity is proportional to anti-cardiolipin antibodies.
- After stopping the reaction by 1N sodium hydroxide, the optical density is read by a spectrophotometer at 405nm. Anti-cardiolipin levels of samples patients are expressed in MPL international units (defined by Harris et al.), using a standard curve.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If determination is not performed immediately, samples should be stored at +2°C/+8°C for no longer than a week or frozen.
- To avoid any non-specific fixation, samples which have been frozen for more than 6 months or which are cloudy, should be centrifuged and filtered.

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents and assay strips at +2°C/+8°C in the ir 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.

REAGENTS

| | | HM006 |
|--|--|-----------|
| Cardiolipin coated microplate with individual breakaway wells with holder MP | | 12 strips |
| 4 standards in MPL international units. <u>Ready to use</u> <i>The values are shown on the vial label.</i> CAL n | | 4 x 1.5mL |
| Positive control in international MPL units. <u>To dilute</u> <i>The values expected are shown on the vial label.</i> CONTROL + | | 350µL |
| Negative control <u>To dilute</u> CONTROL - | | 350µL |
| Goat anti-human IgM conjugate PAL <u>Ready to use</u> CONJ IgM | | 15mL |
| Substrate tablets (vial of 6 tabs) <u>To dilute</u> SUBS PNPP | | 1 |
| Phosphate buffer (pH 7,2) 10X concentrated <u>To dilute</u> BUF WASH 10x | | 100mL |
| Substrate dilution buffer <u>Ready to use</u> BUF SUBS | | 35mL |
| Solution A: dilution and washing buffer <u>To dilute</u> BUF Sol.A | | 15mL |
| Stop solution: Sodium hydroxide 1N <u>Ready to use</u> SOLN STOP | | 9mL |

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- timer
- incubator adjusted at 37°C
- physiological serum (NaCl 0.9%)
- microplate spectrophotometer with 405 nm filter
- 8 channel pipettes

SETUP

All the reagents should be prepared as required:

1. Preparation of Phosphate buffer solution

- Dilute concentrated Phosphate buffer 1/10 indistilled water.
- Storage period: 3 month at +2°C/+8°C.

NB. If there are crystals in the concentrated solution, warm the bottle to 37°C for 15 minutes before use.

2. Preparation of washing buffer

- Dilute solution A 1/100 in Phosphate buffer solution.

3. Preparation of dilution buffer (solution D)

- Dilute solution A 1/10 in Phosphate buffer.

4. Preparation of samples and controls.

- Dilute to 1/50 in dilution buffer (solution D) :
Ex: 10µL sample qsp 0,5mL solution D and shake vigorously at the vortex.

5. Preparation of ready-to-use conjugate.

- Estimate amount required for handling and transfer to a tube.

6. Preparation of the substrate.

- Dissolve the PNPP tablets in the substrate dilution buffer at a ratio of 1 tablet per 5 .
- Protect from light until use.

PRECAUTIONS

Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-25°C) before handling.

Check that all plates are well drained after each wash.

Do not put plates on top of each other during incubation at 37°C.

Check that no condensed water is left at the bottom of the wells before reading.

Human sources for the preparation of standards and controls have been tested and found negative for antibody to HIV 1 and 2, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B virus antigen. Nevertheless, no test can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled as potentially infective materials.

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

CARDIO-LISA IgM has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

CARDIO-LISA IgM has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute reagents from other manufacturers. Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test. Close adherence to the test procedure will assure optimal performance.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

Set out:

- one blank reagent well (made up with solution D: dilution buffer)
- in duplicate:
 - 4 standard wells
 - 1 well for each control
 - to obtain more precise results, it is also advisable to run samples in duplicate.
- then detach the exact number of wells needed and return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

2. Sample incubation

Add 100µL of standards, diluted controls or samples.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion

Wash 3 times with 200µL of washing buffer

3. Incubation of conjugate

Add 100µL of conjugate

Incubate for 30 minutes at room temperature

Wash step:

Repeat the procedure described previously

Make a last wash with 200µL of 0,9% sodium chloride.

4. Incubation of substrate

Add 100µL substrate into each well

Incubate for 30 minutes in the dark at 37°C.

5. Stop solution

Add 50µL of 1N sodium hydroxide to each well.

6. Reading

Read the optical density of each well at 405 nm against the reagent blank set at zero absorbance within 30 minutes.

RESULTS

Standard curve

Determine the mean optical density for all duplicate readings.

Trace the standard curve on log-log paper, plotting the units of the 4 standard points along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).

Comments

- The mean OD of the standard 4 should be at least 0.8.
- The samples with values greater than that of standard 4 may be diluted to 1/200 to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by 4.

INTERPRETATION OF RESULTS

| MPL units | < 10 | 10-15 | > 15 |
|-----------|----------|------------------|----------|
| Results | Negative | Weakly positive* | Positive |

*Weakly positive results should be controlled on a second specimen obtained a few weeks later and interpreted in the light of the results of additional investigations and the clinical context.

QUALITY CONTROL

The kit contains positive and negative controls. Both positive and negative control should be included with each run of the test. Positive control concentration should fall within the range printed on the positive control label. If either reagent control is invalid, the test should be repeated.

bmd offers a multiparameter quality control (Immunotrol II, Cat. No. HM037) which contains antibodies directed against cardiolipin; it must be handled in the same way as samples.













REFERENCES

- ABUAF N. et al.
Vers une standardisation du dosage des anticorps anti-cardiolipine.
STV 1993, 5 : 663-671
- BEVER E.M.
Cofacteurs involved in the antiphospholipid syndrome.
Editorial.
Lupus 1992, 1 : 51-53
- FONT J.
Anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases : isotype distribution and clinical associations.
Clin. Rheum. 1989, 8 : 475-785
- HESS D.C.
Anticardiolipin antibodies : a study of frequency in TIA and stroke.
Neurology 1991, 23 (suppl) : 129-132
- INFANTE RIVARD C. et al.
Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and fetal loss. A case control study.
N. Engl. J. Med. 1991, 325 : 1063-1066
- LARAKI R.
Le syndrome des antiphospholipides
STV 1991, 325 : 363-369
- MEYER O., ROUQUETTE A-M et YOUINOU P.
Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes.BMD Editions (1999).

SUMMARY OF METHOD

| | AMOUNT TO BE DISTRIBUTED | REAGENTS | INCUBATION CONDITIONS |
|-------------------------|--|------------------------------|----------------------------|
| INCUBATION OF SAMPLES | 100µL | Solution D: blank reagent | 30 min at room temperature |
| | 100µL | Standards (double) | |
| | 100µL | Diluted controls (double) | |
| | 100µL | Diluted samples | |
| WASHING | Wash 3 times with washing buffer (200µL/ well) | | |
| INCUBATION OF CONJUGATE | 100µL | Anti-human IgM PAL conjugate | 30 min at room temperature |
| WASHING | Wash 3 times with washing buffer (200 µL/ well) Wash once with NaCl 0.9% (200 µL/ well) | | |
| ENZYME REACTION | 100µL | Substrate solution | 30 min at +37°C |
| STOP REACTION | 50µL | NaOH 1N | |

SYMBOLS USED

| | | | |
|---|-----------------------------------|---|------------------------|
|  | EC Declaration of conformity |  | Number of test |
|  | ELISA Test |  | Consult Instructions |
|  | <i>In Vitro</i> Diagnostic Device |  | Manufactured by |
|  | Catalogue number |  | Temperature limitation |
|  | Lot Number |  | Biological risk |
|  | Expiry Date |  | Reconstitute with |

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
Internet : www.bmd-net.com

