

PHOSPHO-LISA IgG

REF HM 007G



DÉFINITION

Le coffret **PHOSPHO-LISA IgG (bmd)** permet le dépistage des anticorps anti-phospholipides de type IgG dans le sérum ou le plasma humain par une méthode immunoenzymatique.

Un mélange de quatre phospholipides (trois anioniques et un neutre) est utilisé pour sensibiliser la microplaque afin de mettre en évidence les anticorps anti-phospholipides impliqués dans différentes pathologies.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les anticorps anti-phospholipides (APL) sont des immunoglobulines de classe IgG, IgM ou IgA ayant pour cibles antigéniques les phospholipides (PL) anioniques (cardiolipine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol) et également, des phospholipides neutres comme la phosphatidyléthanolamine et, à un degré moindre, la phosphatidylcholine.

Les APL sont des inhibiteurs qui interfèrent avec les étapes de la coagulation dépendant des phospholipides.

La détection des APL par méthode ELISA nécessite la présence de cofacteurs sériques. L'interaction entre cofacteurs et PL se traduit par la formation de complexes protéine-PL qui induisent la formation de néoantigènes reconnus spécifiquement par les APL.

Dans le cas des PL anioniques le cofacteur a pu être identifié comme étant la β_2 -glycoprotéine 1 ou apolipoprotéine H. Pour la phosphatidyléthanolamine, des travaux préliminaires suggèrent l'implication d'un autre cofacteur présent dans le sérum humain.

Le terme de syndrome des anti-phospholipides associe la présence d'un ou plusieurs critères cliniques, thrombose veineuse et/ou artérielle, avortement précoce à répétition, thrombopénie, à la présence d'un APL avec ou sans anticoagulant circulant.

En dehors de ce syndrome, les APL ont été décrits dans diverses situations cliniques :

- maladies autoimmunes
- néoplasies
- thrombopénies
- infections (syphilis, SIDA...)
- prises de certains médicaments

ÉCHANTILLONS

- Le test peut être réalisé avec des sérums ou plasmas non décomplémentés.
- Éviter 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.

PRINCIPE DU TEST

Un mélange de quatre antigènes phospholipidiques est adsorbé sur un support solide constitué de 12 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-IgG humaine couplé à la phosphatase alcaline qui se fixe aux complexes Antigène-Anticorps précédemment formés. 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-phospholipides IgG 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 GPL permet, par interpolation, de définir le titre du sérum patient.

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.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

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

COMPOSITION DES COFFRETS

Une microplaque munie de barrettes amovibles sécables puits par puits recouverts d'un mélange de quatre phospholipides. MP	12 barrettes
Quatre flacons d'Étalons titrés en unités GPL <u>Prêt 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 titré en unités GPL <u>A diluer</u> <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i> CONTROL +	1 x 350µl
Un flacon de Contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL -	1 x 350µl
Un flacon de Conjugué anti-IgG humaine couplé à la PAL <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ IgG	1 x 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 10x) <u>A reconstituer en eau distillé</u> BUF WASH 10x	1 x 100ml
Un flacon de Tampon de dilution substrat <u>Prêt à l'emploi</u> BUF SUBS	1 x 35ml
Un flacon de Tampon de dilution et de lavage : solution A <u>A diluer</u> BUF Sol.A	1 x 15ml
Un flacon de Solution d'arrêt (NaOH 1N) <u>Prêt à l'emploi</u> SOLN STOP	1 x 9ml

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 (Solution S)

- 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°C/+25°C) avant la manipulation.

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

Éviter 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 **PHOSPHO-LISA IgG** 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.

PHOSPHO-LISA IgG 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 :
 - 1 puits « blanc réactif » constitué par du tampon de dilution (solution D)
 - 2 x 4 puits pour les étalons (dépôts en double)
 - 2 x 1 puits pour chaque contrôle (dépôts 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 dans les puits appropriés, notés sur la feuille de dépôt.

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.

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.

2. SEUIL DE POSITIVITÉ

Il a été déterminé à partir de 100 échantillons provenant d'individus sains.

-le seuil de positivité, correspond à la moyenne des DO + 3 déviations standard pour la population testée (soit le 97^{ème} percentile de la distribution des DO).

-entre 3 et 5 déviations standard les échantillons sont considérés faiblement positifs.

3. EXACTITUDE

Principe : échantillon négatif surchargé par des quantités croissantes du sérum positif titré

Le pourcentage de recouvrement est égal à :

(titre obtenu/titre théorique) x 100

	Pourcentage moyen
Isotype IgG	96%

Linéarité du recouvrement : de 5 à 100 unités

4. REPRODUCTIBILITÉ

(Estimée sur 3 échantillons: fortement positif, faiblement positif et négatif)

	INTRA-ESSAI		INTER-ESSAIS		
	Titre	n	CV (%)	n	CV (%)
Isotype IgG	11 GPL	5	4,7	5	6,0
	26,5 GPL	5	3,6	5	6,0
	43 GPL	5	5,2	5	7,4

5. SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ PAR RAPPORT À UN PANEL DE RÉFÉRENCE

Les sérums de 141 patients ont été sélectionnés sur une pathologie potentiellement reliée à la présence d'anticorps anti-phospholipides (PL) :

Maladies autoimmunes (72 dont 56 Lupus Erythémateux Disséminé), thromboses artérielles ou veineuses (18), pertes foetales répétées (11), vascularites (23), syndromes neurologiques (4), cancer (3), HIV (3), divers (7).

Recherche des 4 spécificités individuelles

Les anticorps anti-cardiolipine (CL) ont été mesurés à l'aide des coffrets CARDIO-LISA IgG (BMD). Les autres spécificités : anti-phosphatidylinositol (PI), anti-phosphatidylsérine (PS) et anti-phosphatidyléthanolamine (PE) ont été recherchées selon la même procédure.

79/141 (56%) se sont révélés positifs pour au moins l'une des quatre spécificités suivant les profils suivants :

► Distribution des isotopes

L'isotype IgG était le plus répandu, seul (67%) ou associé à l'isotype IgM (28%).

Distribution des spécificités antigéniques (exprimée en pourcentage)

	CL	PI	PS	PE
IgG	92	96	89	25

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 GPL	< 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'exams 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 externe (Immuno-Trol I, réf : HM036) qui peut être testé en parallèle. Il renferme des anticorps humains d'isotype IgG dirigés contre les phospholipides. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

1. DOMAINES DE MESURE (POUR UNE DILUTION DES ÉCHANTILLONS AU 1/50)

Zone de linéarité : 0 à 100 unités

Zone de sécurité : supérieure à 1000 unités

Interférences biologiques liées à l'aspect du sérum (lyse globulaire, turbidité) : aucune

➤ **Distribution selon la nature des cibles antigéniques (poly- et monospécificités)**

La plupart des échantillons positifs étant dirigés contre les trois phospholipides anioniques :

	IgG (n)
Polyspécifiques : anti-PL anioniques	49
Polyspécifiques : anti-PL anioniques et anti-PE	18
Monospécifiques :	8 dont:
-anti-CL	2
-anti-PI	5
-anti-PS	0
-anti-PE	1

Détection simultanée des 4 spécificités à l'aide du coffret PHOSPHO-LISA

Les 141 échantillons testés préalablement ont été testés avec le coffret PHOSPHO-LISA. Sensibilité et spécificité ont été comparées avec les résultats obtenus pour chaque spécificité testée isolément.

Sensibilité : 100% : tous les échantillons positifs, pour au moins l'une des 4 spécificités, ont été retrouvés positifs avec le coffret PHOSPHO-LISA.

Spécificité : 98,5% pour l'isotype IgG : sur les 66 échantillons négatifs pour les 4 spécificités testées individuellement, un seul a été retrouvé faiblement positif (13 unités).

BIBLIOGRAPHIE

ALARCON-SEGOVIA D, CABRAL A.R.
Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies : A classification.
J. Rheum., 19, 1166-1169, 1992.

ASHERSON R.A., KHAMASTA M.A., ROS J.
The "primary" antiphospholipid syndrome : major clinical and serological features.
Med., 68, 366-373, 1989.

GALLI M., BARBUI T., CONFURIUS P. ZWALL R.F.A., BEVERS E.M.
Anticoagulant mechanisms of antiphospholipid antibodies.
Lupus Anticoagulants : Recent advances in diagnosis and understanding -ISTH Congress, Satellite Symposium-NEW-YORK 1993

HARRIS E.N.
Annotation - Antiphospholipid antibodies
Br. J. Haematol., 74, 1-9, 1990

LAROCHE P, BERARD M, ROUQUETTE AM, DESGRUELLE, C. BOFFA MC.
Advantage of using both anionic and switterionic phospholipid antigens for the detection of antiphospholipid antibodies
Am J Clin Pathol 106, 549-554, 1996

LOIZOU S., MACKWORTH-YOUNG C.G., COFINER C., WALPORT M.J.
Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipids of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus.
Clin. Exp. Immunol., 80, 171-176, 1990

Mc INTYRE J.A., WAGENKNECHT D.R., SUGI T.
Role of lipoprotein cofactors in the detection of antiphospholipid antibodies.
Lupus Anticoagulants : Recent Advances in diagnosis and understanding -ISTH Congress, Satellite Symposium-NEW-YORK 1993

MEYER O., ROUQUETTE A-M et YOUINOU P.
Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes.
BMD Editions (1999).

TRIPLETT D.A., BRANDT J.T., MUSGRAVE K.A., ORR C.A.
The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipids.
J. Am. Med. Ass., 259, 550-554, 1988.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	ISOTYPE IgG	CONDITIONS D'INCUBATIONS
INCUBATION	100µl	Solution D : puits blanc réactif	30 mn à température ambiante
	100µl	Etalons : puits étalon (en double)	
	100µl	Echantillon ou contrôles dilués	
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de lavage (200µl/puits)		
ETAPE DU CONJUGUÉ	100µl	Conjugué anti-IgG humaine-PAL	30mn 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	30mn à +37°C Chambre humide
ARRÊT DE LA RÉACTION	50µl	NaOH 1N Solution d'arrêt	

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Référence produit



Numéro de Lot



Date d'expiration



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



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



PHOSPHO-LISA IgG

REF HM 007G



INTENDED USE

PHOSPHO-LISA IgG (bmd) is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of IgG anti-phospholipid antibodies in human serum or plasma samples.

A mixture of four phospholipids (three anionic and one zwitterionic) is used to coat the microplate in order to reveal the anti-phospholipid antibodies involved in different clinical conditions.

DIAGNOSTIC VALUE

Anti-phospholipids (APL) are IgG, IgM or IgA immunoglobulins, whose antigen targets are anionic phospholipids (PL) (cardiolipin, phosphatidylserine, phosphatidylinositol) and also zwitterionic phospholipids such as phosphatidylethanolamine and, to a lesser extent, phosphatidylcholine.

APL are inhibitors, interfering in the phospholipid-dependent stages of coagulation.

APL detection using the ELISA method calls for the presence of serum co-factors. The interaction between co-factors and PL is revealed by the formation of protein-PL complexes which induce the formation of neoantigens specifically recognised by the APL.

The co-factor for anionic PL has been identified as β_2 -glycoprotein I or apolipoprotein H. Preliminary studies suggest that there is a different co-factor for phosphatidylethanolamine which is present in human serum.

The term "Anti-phospholipid syndrome" describes the association of one or several clinical criteria, venous and/or arterial thrombosis, repeated early abortion, thrombopenia with the presence of an APL with or without a circulating anticoagulant.

Apart from this syndrome, APLs have been implicated in a variety of clinical conditions:

- autoimmune disease
- cancer
- thrombopenia
- infection (syphilis, AIDS)
- consumption of some drug

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum or plasma.
- 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.

ASSAY PRINCIPLE

A mixture of four phospholipids is coated onto a polystyrene microtiter plate (12 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the antigen coated well in duplicate to detect IgG antibodies. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Binding of anti-phospholipid antibodies is detected using anti-human IgG alkaline phosphatase labelled conjugates. 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-phospholipid antibodies level in the sample.
- After stopping the reaction by 1N sodium hydroxide, the optical density is read by a spectrophotometer at 405nm

Anti-phospholipid levels of samples patients are expressed in GPL, using a standard curve.

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.

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

REAGENTS

Microplate coated with Phospholipids (12x8 individual breakaway wells with holder) MP	12 strips
4 Standards in GPL international units Ready to use CAL n <i>The values are shown on the vial label.</i>	4 x 1.5mL
1 vial of Positive control in international GPL units To dilute CONTROL + <i>The values expected are shown on the vial label.</i>	1 x 350µL
1 vial of Negative control To dilute CONTROL -	1 x 350µL
1 vial of Goat anti-human IgG conjugate PAL Ready to use CONJ IgG	1 x 15mL
1 vial of Substrate containing 6x5mg PNPP tablets To dilute SUBS PNPP	1
1 vial of Phosphate buffer pH 7,2 (concentrated 10x) BUF WASH 10x To dilute in distilled water	1 x 100mL
1 vial of Substrate dilution buffer Ready to use BUF SUBS	1 x 35mL
1 vial of Solution A : dilution and washing buffer To dilute BUF Sol.A	1 x 15mL
1 vial of Stop solution (Sodium hydroxide 1N) Ready to use SOLN STOP	1 x 9mL

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°C--+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.

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

PHOSPHO-LISA IgG 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)
 - 4 standard wells for the detection of IgG antibodies (in duplicate)
 - 1 well for each positive control (in duplicate)
 - 1 well for the negative control(in duplicate)
 - 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.

2. THRESHOLD VALUES

Selected population : 100 sera from healthy individuals
 - the positive threshold corresponds to the mean of the OD + 3 standard deviations, obtained for the population tested (i.e, 97th percentile OD distribution)
 - between 3 and 5 standard deviations, samples are considered as weakly positive.

3. ACCURACY

Estimated by recovery test.
 Principle: negative sample is supercharged with increasing quantities of a positive sample.
 The overlap percentage equals (titre obtained/ theoretical titre) x 100.

	Mean percentage
IgG Isotype	96%

Linear recovery : from 5 to 100 units

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.

4. REPRODUCIBILITY

Estimated on the basis of 3 samples : positive, weakly positive and negative.

	INTRA-ESSAI			INTER-ESSAIS	
	Titre	n	CV (%)	n	CV (%)
IgG Isotype	11 GPL	5	4.7	5	6.0
	26.5 GPL	5	3.6	5	6.0
	43 GPL	5	5.2	5	7.4

INTERPRETATION OF RESULTS

GPL or 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 an external multiparameter quality control (Immunotrol I, Cat: HM036). It contains antibodies IgG directed against phospholipid and cardiolipin antigens. This control should be handled as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

1. MEASURE RANGE (FOR 1:50 SAMPLES DILUTION)

Linear range : 0 to 100 units
 Security range: > 1000 units

5. SENSITIVITY, SPECIFIC AFFINITY AND AGREEMENT WITH ANOTHER METHOD

Sera from 141 patients have been selected for potential AP related disorders :
 Autoimmune diseases (72 including 56 Sytemic Lupus Erythematosus), arterial or venous thrombosis (18), recurrent fetal losses (11), vasculitides (23), neurologic syndrome (4), neoplasia (3), HIV (3), miscellaneous (7).

Measurement of APL using individual phospholipids as antigens

Anti-Cardiolipine (CL) antibodies were measured using commercial ELISA kits (CARDIO-LISA IgG and IgM from BMD). Antibodies directed against anti-phosphatidylinositol (PI), anti-phosphatidylserine (PS) et anti-phosphatidylethanolamine (PE) were measured following the same procedure.

79/141 (56%) were positive for at least one of the four antigenic specificities :

➤ Isotypes distribution pattern

The most common APL isotype was IgG : alone (67%) or associated with IgM (28%).

Antigenic specificities distribution pattern (in percentage)

	CL	PI	PS	PE
IgG	92	96	89	25

➤ **Distribution pattern regarding the antigenic target (multiple or only one target)**

Most of positive samples were directed against the three anionic phospholipids :

	IgG (n)
Multiple targets : APL directed against anionic phospholipids	49
Multiple targets : APL directed against anionic phospholipids and PEP	18
Only one target :	8 with:
-anti-CL	2
-anti-PI	5
-anti-PS	0
-anti-PE	1

Simultaneous measurement of the four specificities using the PHOSPHO-LISA kit

All 141 samples tested previously were evaluated using PHOSPHOLISA. Sensitivity and specificity of the mixed phospholipids assay were compared to those obtained with each individual phospholipid test.

Sensitivity : 100% for both IgG and IgM isotypes : all the samples positive for at least one of the four specificities were also positive with PHOSPHO-LISA.

Specificity : 100% for IgM antibodies et 98,5% for the IgG isotype : Among the 66 samples negative for each of the four phospholipids, 65 were negative with PHOSPHO-LISA. The only one sample, negative with each individual assay , was weakly positive with PHOSPHO-LISA (13 units).

REFERENCES

ALARCON-SEGOVIA D, CABRAL A.R.
Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies : A classification.
J. Rheum., 19, 1166-1169, 1992.

ASHERSON R.A., KHAMASTA M.A., ROS J.
The "primary" antiphospholipid syndrome : major clinical and serological features.
Med., 68, 366-373, 1989.

GALLI M., BARBUI T., CONFURIUS P. ZWALL R.F.A., BEVERS E.M.
Anticoagulant mechanisms of antiphospholipids antibodies.
Lupus Anticoagulants : Recent advances in diagnosis and understanding -ISTH Congress, Satellite Symposium- NEW-YORK 1993

HARRIS E.N.
Annotation - Antiphospholipid antibodies
Br. J. Haematol., 74, 1-9, 1990

LAROCHE P, BERARD M, ROUQUETTE AM, DESGRUELLE, C. BOFFA MC.
Advantage of using both anionic and switterionic phospholipid antigens for the detection of antiphospholipid antibodies
Am J Clin Pathol 106, 549-554, 1996

LOIZOU S., MACKWORTH-YOUNG C.G., COFINER C., WALPORT M.J.
Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipids of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus.
Clin. Exp. Immunol., 80, 171-176, 1990

Mc INTYRE J.A., WAGENKNECHT D.R., SUGI T.
Role of lipoprotein cofactors in the detection of antiphospholipid antibodies.
Lupus Anticoagulants : Recent Advances in diagnosis and understanding -ISTH Congress, Satellite Symposium- NEW-YORK 1993













MEYER O., ROUQUETTE A-M et YOUINOU P.
Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes.
BMD Editions (1999).

TRIPLETT D.A., BRANDT J.T., MUSGRAVE K.A., ORR C.A.
The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipids.
J. Am. Med. Ass., 259, 550-554, 1988.

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	IgG ISOTYPE	INCUBATION CONDITIONS
INCUBATION OF SAMPLES	100µL	Solution D: blank reagent	30 min at room temperature
	100µL	Standards (double)	
	100µL	Diluted controls and samples	
WASHING	Wash 3 times with washing buffer (200µL/ well)		
INCUBATION OF CONJUGATE	100µL	Anti-IgG PAL conjugate	30 min at room temperature
WASHING	Wash 3 times with washing buffer (200µL/ well) Wash once with NaCl 0.9% (200µL/ 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

