

β_2 -LISA IgG/IgM

REF HM 018



2 x 48 tests

DÉFINITION

Le coffret β_2 -LISA IgG/IgM permet la détection par méthode ELISA des anticorps humains dirigés contre la β_2 -glycoprotéine I ou Apolipoprotéine H, d'isotype IgG ou IgM.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les anticorps antiphospholipides (aPL) constituent une famille très hétérogène d'autoanticorps, détectés par l'allongement *in vitro* des tests de coagulation phospholipides-dépendants et par des méthodes ELISA utilisant la cardiolipine ou d'autres phospholipides anioniques ou neutres. Les maladies les plus fréquemment associées aux aPL 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. Le terme de syndrome des antiphospholipides associe la présence d'un ou plusieurs critères cliniques, thromboses veineuses et/ou artérielles, avortements à répétition, naissances prématurées, morts fœtales, à la présence d'un anticoagulant circulant, d'un aPL et/ou d'anti-B2-GP1 avec persistance sur deux prélèvements ou plus.

La détection par méthode ELISA de certains aPL anioniques, rencontrés dans les maladies autoimmunes, nécessite la présence d'une protéine sérique : la β_2 -glycoprotéine I (β_2 -GPI) ou Apolipoprotéine H. A l'inverse, lors des infections qui ne s'accompagnent généralement pas de phénomènes thrombotiques, sa présence n'est pas requise.

La β_2 -GPI est une protéine plasmatique de 50kDA, présente à une concentration de 200 μ g/ml, sous forme d'une chaîne polypeptidique de 326 acides aminés. Sa forte affinité pour les phospholipides est à l'origine de ses propriétés anticoagulantes *in vitro* sur la coagulation et l'agrégation plaquettaire.

La plupart des auteurs considèrent aujourd'hui que les aPL β_2 -GPI-dépendants sont probablement dirigés contre la protéine structurellement modifiée par sa liaison aux PL. Leur reconnaissance *in vitro* de la β_2 -GPI implique l'utilisation d'une phase solide irradiée, afin de reproduire ce changement de conformation. Ils confirment l'intérêt de caractériser les aPL dirigés contre des phospholipides anioniques, en testant leur spécificité antigénique vis-à-vis de la β_2 -GPI, afin d'accroître leur valeur prédictive du risque thrombotique dans les pathologies autoimmunes et corrélées à la survenue d'un syndrome des aPL.

PRINCIPE DU TEST

L'antigène purifié β_2 -GPI (d'origine humaine) 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 chacun des puits. S'il contient les autoanticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer à l'antigène. Après incubation, un premier lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.

- On ajoute ensuite un conjugué monoclonal de souris anti-IgG humaine ou anti-IgM humaine couplé à la peroxydase de Raifort 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 ABTS (2,2 Azino-di-[3-sulfonate déthyl benzthiazoline]). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps anti- β_2 GPI présents dans l'échantillon.
- L'addition de H₂SO₄ (0.25M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 405nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- Une gamme d'étalonnage constituée de 3 étalons titrés, permet, par interpolation, de définir le titre de l'échantillon pour chaque isotype.

ECHANTILLONS

- Le dosage d'anticorps peut être effectué sur sérum.
- 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 congelés.
- 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.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau distillée
- Pipettes de précision
- Lecteur muni d'un filtre 405 nm
- Peigne de lavage 8 canaux.

COMPOSITION DU COFFRET

	IgG	IgM
Une microplaque de 12 barrettes amovibles, sécables puits par puits, sensibilisés par la β_2 -GPI. MP	12 barrettes	
3 flacons de Standards titrés pour l'isotype IgG / IgM Prêt à l'emploi CAL n <i>Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.</i>	3 x 1,5ml	
1 flacon de Contrôle positif titré en unités arbitraires pour l'isotype IgG <u>A diluer</u> CONTROL + <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i>	350 μ l	
1 flacon de Contrôle positif titré en unités arbitraires pour l'isotype IgM <u>A diluer</u> CONTROL + <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i>	350 μ l	
1 flacon de Contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL -	350 μ l	
1 flacon de Conjugué anti-IgG humaine couplé à la peroxidase Prêt à l'emploi. CONJ IgG	15ml	
1 flacon de Conjugué anti-IgM humaine couplé à la peroxidase Prêt à l'emploi. CONJ IgM	7.5ml	
1 flacon de Substrat (ABTS) Prêt à l'emploi SUBS ABTS	15 ml	
1 flacon de Tampon Phosphate-Tween pH 7,2 (concentré 10x) <u>A reconstituer en eau distillé</u> BUF WASH 10x	100ml	
1 flacon de solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25M) Prêt à l'emploi SOLN STOP	15ml	

Remarque: Le conjugué anti-IgM est en quantité suffisante pour réaliser 48 tests. Le conjugué anti-IgG est en quantité suffisante pour être utilisée sur la totalité de la microplaque.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

1. 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 (ne pas utiliser si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent)

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

2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons au 1/101 dans le tampon TDL.
Ex : 10 μ l + 1ml de tampon TDL
- Agiter vigoureusement au vortex.

3. 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.

4. Utilisation du substrat - prêt à l'emploi

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

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Retirer tous les réactifs hors de leur logement de conditionnement et les ramener impérativement à température ambiante (+18°C / +25°C) au minimum une demi-heure avant de commencer le dosage.

⚠ La température des réactifs peut influencer le résultat final.

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

Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.

L'étalon 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 solutions (excepté la solution d'arrêt) 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.

Le coffret β_2 -LISA IgG/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.

β_2 -LISA IgG/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.

Pour la recherche de chaque isotype, prévoir :

- 1 puits « blanc réactif » (constitué par le tampon TDL)
- 3 x 2 puits pour les « étalons » (dépôts en double)
- 2 x 2 puits pour les contrôles (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 échantillons

Déposer 100 μ l d'étalons, contrôles ou échantillons dilués.

Laisser incubé 30 minutes à température ambiante (+18°C/+25°C).

Vider les puits par retournement de la plaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon TDL (300 μ l/puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

3. Incubation des Conjugués

Déposer 100µl de chaque conjugué prêt à l'emploi dans sa partie respective.

Incuber 30 minutes à température ambiante (+18°C/+25°C).

Vider les puits par retournement de la plaque.

Laver 3 fois avec le tampon TDL (300µl par puits).

Éliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant.

4. Incubation du Substrat

Déposer 100µl de substrat dans chaque puits.

Incuber 30 minutes à température ambiante (+18°C/+25°C).

5. Arrêt de la réaction

Rajouter 100µl de H₂SO₄ (0,25M) dans chaque puits.

6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits avec un lecteur de microplaques muni d'un filtre 405nm 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 3 points

- Calculer les DO moyennes pour les étalons, les contrôles et les échantillons patients (si ils ont été traités en double).
- Tracer la courbe d'étalonnage sur du papier logarithmique (en log/log) en portant en abscisses (axe des X) les unités des points étalons et en ordonnées (axe des Y) les densités optiques (DO) correspondantes.

Remarques :

- La DO moyenne de l'étalon 3 doit être au moins égale à 0.8
- Le coefficient de régression linéaire doit être supérieur à 0,990 pour que les essais soient validés.
- Les échantillons présentant des valeurs supérieures à celle de l'étalon peuvent être dilués au 1/400 afin d'obtenir une meilleure précision. Le nombre d'unités sera alors multiplié par 4.

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

Anti-β ₂ -GPI IgG ou IgM Unités Arbitraires (UM ou UG)	< 10	≥10
Résultats	Négatif	Positif

Recommandations émises lors du XI^{ème} Symposium International sur les anticorps anti-phospholipides

Le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) est caractérisé par l'association de manifestations cliniques et la présence de marqueurs biologiques définis par un consensus international. Ces critères incluent les anticorps anti-β₂-GPI.

Un SAPL est matérialisé par la présence d'au moins un critère clinique et au moins un critère biologique.

Le délai entre deux prélèvements pour vérifier la persistance des critères biologiques est d'un minimum de 12 semaines et d'un maximum de 5 ans.

LIMITES

Du fait des différences qui peuvent exister entre les laboratoires et les régions en rapport avec la population, l'alimentation, les techniques du laboratoire et la sélection

des groupes de référence, il est important pour chaque laboratoire d'établir la validité des valeurs de référence suggérées ci-dessus.

Les sérums hémolysés, lipémiques, icteriques, présentant des taux élevés en IgG monoclonal, des complexes immuns ou des facteurs rhumatoïdes peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le coffret contient un contrôle positif et un contrôle négatif. Il est conseillé de les doser pour 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 II, réf : HM037) qui peut être testé en parallèle. Il renferme des anticorps dirigés contre la β₂-GPI. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

1. SENSIBILITE, SPECIFICITE, CONCORDANCE PAR RAPPORT À UN AUTRE COFFRET ELISA

Le nouveau coffret β₂-LISA IgG/IgM développé en Peroxidase par bmd a été comparé à deux coffrets ELISA commercialisés.

a. Evaluation du coffret β₂-LISA IgG

L'étude a porté sur 172 échantillons dont :

⇒ 80 échantillons provenant d'une population pathologique des anticorps anti-β₂-GPI.

⇒ 92 échantillons provenant d'individus sains ou susceptibles de provoquer des interférences biologiques (complément, cryoglobulines, facteur rhumatoïde, hypergammaglobulines, IgG monoclonales, IgM monoclonales, plasmas, sérums hémolysés).

Résultats

		Kit commercial β ₂ -GPI IgG ELISA		
		+	-	
bmd β ₂ -LISA IgG	+	60	9	Sensibilité relative : 93.8% Spécificité relative : 91.7% Concordance : 92.4%
	-	4	99	

b. Evaluation du coffret β₂-LISA IgM :

L'étude a porté sur 158 échantillons dont :

⇒ 61 échantillons provenant d'une population pathologique testée pour des anticorps anti-β₂-GPI.

⇒ 97 échantillons provenant d'individus sains ou susceptibles de provoquer des interférences biologiques (complément, cryoglobulines, facteur rhumatoïde, hypergammaglobulines, IgG monoclonales, IgM monoclonales, plasmas, sérums hémolysés).

Résultats

		Kit commercial β ₂ -GPI IgM ELISA		
		+	-	
bmd β ₂ -LISA IgM	+	43	16	Sensibilité relative : 89.6% Spécificité relative : 85.5% Concordance : 86.7%
	-	5	94	

2. CORRESPONDANCE AVEC L'ÉTALON SAPPORO

Le tableau ci-dessous établit la correspondance entre les résultats obtenus avec le test **β 2-LISA IgG/IgM** et l'étalon SAPPORO (HCAL)

Dilution	IgG		IgM	
	Unités SAPPORO (μ g/ml)	β 2-LISA	Unités SAPPORO (μ g/ml)	β 2-LISA
1/100	20.4	80	15.6	181
1/200	10.2	49	7.8	10
1/400	5.1	28	3.9	65
1/800	2.55	15	1.95	32
1/1600	1.275	8.3	0.975	16
1/3200	0.6375	4.3	0.4875	10
1/6400	0.31875	2.6	0.24375	5

3. PRÉCISION DU TEST

Estimée sur 3 échantillons positifs en IgG et en IgM : faiblement positif, positif et fortement positif.

β 2-LISA IgG		β 2-LISA IgM	
Intra-essai (10 tests dans le même essai)		Intra-essai (10 tests dans le même essai)	
Titres moyens	CV (%)	Titres moyens	CV (%)
21.0	4.0	28	10.0
45.0	2.0	48	8.0
170	4.0	62	6.0

β 2-LISA IgG		β 2-LISA IgM	
Inter-essais (5 tests dans 4 essais différents)		Inter-essais (5 tests dans 4 essais différents)	
Titres moyens	CV (%)	Titres moyens	CV (%)
25	15.0	25	13.0
59.0	9.0	49	9.0
158	10.0	73	9.0

4. SEUIL DE POSITIVITÉ

Estimée par la méthode des percentiles sur 56 échantillons issus de donneurs sains.

	β 2-LISA IgG/IgM
Seuil de positivité : 10 unités arbitraires (UM ou UG)	99 ^{ème} percentile

Les échantillons > 10 UM ou UG sont considérés comme positifs.













BIBLIOGRAPHIE

- Abuaf N et al** : Prevalence of anti- β 2-glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in 2174 patients and 107 healthy controls. *Nouv Rev Fr Hematol* 1995, 37: S53-S56.
- Alarcon-Segovia D, Cabral A** : The concept and classification of antiphospholipid/cofactor syndromes. *Lupus* 1996, 5: 364-367.
- Arvieux J et al** : Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β 2-glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods* 1991, 143: 223-229.
- Boffa MC** : Detection of antiphospholipid-protein antibodies and management of the antiphospholipid syndrome. *Ann Med Interne* 1996, 147 (1): 3-4.
- Darnige L, Arvieux J** : β 2-glycoprotéine I (apolipoprotéine H) et anticorps antiphospholipides. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1994, 6: 687-692.
- Galli M et al** : Anticardiolipin antibodies directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990, 335: 1544-15551.
- Hunt JE, Krilis SA** : The fifth domain of β 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281-Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994, 152: 653-659.
- Martinuzzo ME et al** : Anti- β 2-glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *BJ Haematol* 1995, 89: 397-402.
- Matsuura E et al** : Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990, 336: 177-178.
- Matsuura E et al** : Anticardiolipin antibodies recognize β 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994, 179: 457-462.
- McNeil HP et al** : Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation; β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.
- Miyakis S. et al** : International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost* 2005, 3: 1-12.
- Sorice M et al** : Anticardiolipin and anti β 2-GPI are two distinct populations of autoantibodies. *Thromb Haemost* 1996, 75: 393-398.
- Roubey RA et al** : Anticardiolipin autoantibodies recognize β 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of antigen density and bivalent binding. *J Immunol* 1995, 154: 954-960.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	RECHERCHE DE L'ISOTYPE		CONDITIONS D'INCUBATION
		IgG	IgM	
INCUBATION ÉCHANTILLONS	100µl	Tampon de dilution: blanc réactif		30 min T.A.
		Etalons (en double)		
		Contrôles dilués (en double)		
		Echantillons dilués		
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon TDL (300µl/puits)			
⚠ <i>Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant</i>				
INCUBATION CONJUGUÉ	100µl	Anti-IgG Perox prêt à l'emploi-	Anti-IgM Perox prêt à l'emploi-	30 min T.A.
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon TDL (300µl/puits)			
⚠ <i>Eliminer le liquide résiduel en tamponnant la plaque sur un papier absorbant</i>				
RÉACTION ENZYMATIQUE	100µl	Solution substrat ABTS		30 min T.A.
ARRÊT DE LA RÉACTION	100µl	Solution d'arrêt H ₂ SO ₄ (0.25M)		/

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



β_2 -LISA IgG/IgM

REF HM 018 

2 x 48 tests

DEFINITION

β_2 -LISA is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the detection of IgG and IgM antibodies directed against β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI), in human serum.

DIAGNOSTIC VALUE

The antiphospholipid antibodies (aPL) are an extremely homogenous family of antibodies, detected by the *in vitro* elongation of phospholipid-dependent coagulation tests and by ELISA techniques which employ cardiolipin or other anionic or neutral phospholipids. The illnesses most often associated with aPL are systemic lupus erythematosus, drug-induced lupus, thrombo-embolic disease and thromboses in general, repeated abortion, autoimmune peripheral cytopenia, primitive biliary cirrhosis, a number of acute infections, retroviral infections, AIDS and HTLV. The expression, antiphospholipid syndrome denotes the association of one or several clinical criteria, venous and/or arterial thrombosis, consecutive abortions, premature births, fetal deaths, to the presence of a circulating anticoagulant, an aPL and/or an anti-B2-GP1 detected on two or more occasions.

The detection of some anionic aPLs found in autoimmune diseases, by ELISA technique calls for the presence of a serum protein, β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) or apolipoprotein H. Conversely, infections which are not generally accompanied by thrombotic elements, do not require its presence.

β_2 -GPI is a 50 kDA plasma protein, occurring at a concentration of 200 μ g/ml, in the form of a polypeptide chain of 326 amino-acids. Its great affinity for the phospholipids is the basis of its *in vitro* anticoagulant effect on coagulation and platelet aggregation.

Today most authors consider that the β_2 -GPI-dependent aPLs are probably directed against the protein which has been structurally modified by linkage with the PLs. Their *in vitro* recognition of β_2 -GPI requires the use of an irradiated solid phase in order to reproduce the change in structure. They confirm the value of detecting the aPL directed against the anionic phospholipids, by testing their antigen specific affinity to the β_2 -GPI, in order to increase their ability to predict the risk of thrombosis.

ASSAY PRINCIPLE

The purified β_2 -GPI antigen (human origin) is coated onto a polystyrene microtiter plate (12 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to two coated wells, which allows the target antibodies of each class to bind to the specific antigen. After incubation, unbound proteins are removed by washing.

- Binding of anti- β_2 -GP1 antibodies is detected using an murine monoclonal anti-human IgG or anti-human IgM antibody conjugated to horseradish peroxidase. After incubation, the wells are washed again to eliminate any excess of conjugate.

- The bound enzyme is revealed by addition of substrate ABTS (2,2 Azino-di-[3-sulfonate déthyl benzthiazoline] , producing a yellow colour. The colour intensity is proportional to anti- β_2 -GP1 antibodies in the sample.

- Adding H₂SO₄ (0.25M) allows to stop the of enzymatic reaction.

- After stopping the reaction by H₂SO₄ (0.25M), the optical density is read by a spectrophotometer at 405nm.

- A range of calibration consisting of 3 titred standards allows to define the title of each IgG/IgM sample.

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.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- distilled water
- precision pipettes
- microplate spectrophotometer with 405 nm filter
- 8 channel pipettes.

REAGENTS

	IgG	IgM
Microplate coated with β_2 -GPI (12x8 individual breakaway wells with holder). MP	12 strips	
3 standards for IgG & IgM isotypes <u>Ready to use</u> CAL n <i>The values are shown on the vial label.</i>	3 x 1,5mL	
1 vial of Positive control titrated in arbitrary units for IgG isotype <u>To dilute</u> CONTROL + <i>Expected values after dilution are printed on the vial label.</i>	350 μ L	
1 vial of Positive control titrated in arbitrary units for IgM isotype <u>To dilute</u> CONTROL + <i>Expected values after dilution are printed on the vial label.</i>		350 μ L
1 vial of Negative control <u>To dilute</u> CONTROL -	350 μ L	
1 vial of Anti-human IgG conjugate coupled to peroxidase <u>Ready to use</u> CONJ IgG	15mL	
1 vial of Anti-human IgM conjugate coupled to peroxydase <u>Ready to use</u> CONJ IgM		7,5mL
1 vial of Substrat solution (ABTS) <u>Ready to use</u> SUBS ABTS	15mL	
1 vial of Phosphate-Tween buffer pH 7,2 (concentrated 10x) <u>To dilute in distilled water</u> BUF WASH 10x	100mL	
1 vial of Stop solution H ₂ SO ₄ (0.25M) <u>Ready to use</u> SOLN STOP	15mL	

N.B. There is enough conjugate anti-IgM for 48 tests. Conjugate anti-IgG is sufficient for the use over the whole microplate.

SETUP

All the reagents should be prepared as required:

1. Dilution and washing buffer

- Dilute concentrated Phosphate Tween Buffer 1/10 in distilled water.
- Storage period: 3 month at +2°C/+8°C (avoid to use if signs of contamination or other visible changes occur)

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

2. Preparation of samples and controls

- Dilute to 1/101 in dilution and washing buffer.
Ex : 10 μ l sample + 1ml dilution and washing buffer
- Vortex vigorously.

3. Use of ready-to-use conjugate.

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

4. Use of ready-to-use substrate.

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

PRECAUTIONS

Place all reagents outside of their packaging location. They must be necessarily returned to ambient temperature (+18°C/+25°C) at least one half an hour before beginning the test.

⚠ The temperature of the reagents could disturb the final result.

Check that all plates are well drained after each wash.

Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.

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 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.

β_2 -LISA IgG/IgM has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

β_2 -LISA IgG/IgM has been optimized for the use as describe in this procedure. Do not substitute other manufacturer'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.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

For each class of antibody, set out:

- 1 "blank reagent" well (made up with dilution and washing buffer)
- 3 x 2 "standard" wells (in duplicate)
- 2 x 2 wells for each 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. Samples incubation

Add 100 μ l of standards or calibrator, diluted controls or samples.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300 μ L of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.

3. Incubation of Conjugates

Add 100µL of each conjugate.
Incubate for 30 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of dilution and washing buffer.

Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.

4. Incubation of Substrate

Add 100µL substrate into each well.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+18°C/+25°C).

5. Stop of the reaction

Add 100µl of H₂SO₄ (0,25M) 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 3 standard points along the abscissa (X axis) and the corresponding OD values along the ordinate (Y axis).

Comments:

- The mean OD of the standard 3 should be at least 0.8.
- The linear coefficient of regression should be higher than 0.990 for the validation of tests.
- The samples with values greater than that of standard 4 may be diluted to 1/400 to obtain a more precise result. The number of units should be multiplied by 4.

INTERPRETATION OF RESULTS

Anti-β ₂ -GPI IgG or IgM Arbitrary Units (GU or MU)	< 10	≥10
Results	Negative	Positive

Recommendations emitted during the XIth International Symposium on antiphospholipid antibodies

The antiphospholipid syndrome (APS) is characterized into clinical and laboratory criteria, defined by an international consensus. These criteria include antibodies anti- β₂-GPI. An APS is diagnosed with the presence of at least one clinical criteria and one biologic criteria.

Between two occasions, the delay to verify the presence of biological criteria is a minimum of 12 weeks and a maximum of 5 years.

LIMITS

Because of differences which may exist between laboratories and locations with respect to population, diet, laboratory technique and selection of reference groups, it is importante for each laboratory to establish the validity of the above suggested range.

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration of IgG and/or complement levels or samples with rheumatoid factor may confound the results of this assay.

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 II, Cat: HM037). It contains antibodies directed against the β₂-GPI. This control should be handled as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCE OF THE TEST

1. SENSITIVITY, SPECIFIC AFFINITY AND AGREEMENT TO OTHER METHODS

The new peroxidase β₂-LISA IgG/IgM kit has been compared to 2 marketed ELISA kits.

a. β₂-LISA IgG kit evaluation

The study was performed on 172 samples of which:

⇒ 80 samples related to a pathological population with anti-β₂-GPI antibodies.

⇒ 92 samples selected from blood donors and from their potential biological interferences (complement, cryoglobulinemia, IgG and IgM monoclonal immunoglobulins, rheumatoid factor, hypergammaglobulinemia, plasmas, lipemic or hemolized samples).

Results

		β ₂ -GPI IgG ELISA marketed Kit		
		+	-	
bmd β ₂ -LISA IgG	+	60	9	Relative sensibility : 93.8% Relative specificity : 91.7% Accuracy : 92.4%
	-	4	99	

b. β₂-LISA IgM kit evaluation

The study was performed on 158 samples of which:

⇒ 61 samples related to a pathological population with anti-β₂-GPI antibodies.

⇒ 97 samples selected from blood donors and from their potential biological interferences (complement, cryoglobulinemia, IgG and IgM monoclonal immunoglobulins, rheumatoid factor, hypergammaglobulinemia, plasmas, lipemic or hemolized samples).

Results

		β ₂ -GPI IgM ELISA marketed Kit		
		+	-	
bmd β ₂ -LISA IgM	+	43	16	Relative sensibility : 89.6% Relative specificity : 85.5% Accuracy : 86.7%
	-	5	94	

2. CORRESPONDENCE WITH SAPPORO STANDARD

The following table establishes the correspondence between results obtained with β_2 -LISA IgG/IgM and SAPPORO standard (HCAL).

Dilution	IgG		IgM	
	SAPPORO Units ($\mu\text{g/mL}$)	β_2 -LISA	SAPPORO Units ($\mu\text{g/mL}$)	β_2 -LISA
1/100	20.4	80	15.6	181
1/200	10.2	49	7.8	10
1/400	5.1	28	3.9	65
1/800	2.55	15	1.95	32
1/1600	1.275	8.3	0.975	16
1/3200	0.6375	4.3	0.4875	10
1/6400	0.31875	2.6	0.24375	5

3. PRÉCISION

Estimated for IgG and IgM isotype on three positive samples : strongly, moderate and weakly positive.

β_2 -LISA IgG		β_2 -LISA IgM	
Intra-assay (10 tests in the same assay)		Intra-assay (10 tests in the same assay)	
Titre	CV (%)	Titre	CV (%)
21.0	4.0	28	10.0
45.0	2.0	48	8.0
170	4.0	62	6.0

β_2 -LISA IgG		β_2 -LISA IgM	
Inter-assays (5 tests in 4 different assays)		Inter-assays (5 tests in 4 different assays)	
Titre	CV (%)	Titre	CV (%)
25	15.0	25	13.0
59.0	9.0	49	9.0
158	10.0	73	9.0

4. THRESHOLD VALUE

Calculated on 56 samples from « blood donors » with the percentile method.

	β_2 -LISA IgG/IgM
Positive threshold 10 arbitrary units (MU or GU)	99 th percentile

Samples > 10 MU or GU are considered positive.

BIBLIOGRAPHY

Abuaf N et al : Prevalence of anti- β_2 -glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in 2174 patients and 107 healthy controls. *Nouv Rev Fr Hematol* 1995, 37: S53-S56.

Alarcon-Segovia D, Cabral A : The concept and classification of antiphospholipid/cofactor syndromes. *Lupus* 1996, 5: 364-367.

Arvieux J et al : Measurement of antiphospholipid antibodies by ELISA using β_2 -glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Methods* 1991, 143: 223-229.

Boffa MC : Detection of antiphospholipid-protein antibodies and management of the antiphospholipid syndrome. *Ann Med Interne* 1996, 147 (1): 3-4.

Darnige L, Arvieux J : β_2 -glycoprotéine I (apolipoprotéine H) et anticorps antiphospholipides. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1994, 6: 687-692.

Galli M et al : Anticardiolipin antibodies directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990, 335: 1544-1551.

Hunt JE, Krilis SA : The fifth domain of β_2 -glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281-Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994, 152: 653-659.

Martinuzzo ME et al : Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *BJ Haematol* 1995, 89: 397-402.

Matsuura E et al : Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990, 336: 177-178.

Matsuura E et al : Anticardiolipin antibodies recognize β_2 -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994, 179: 457-462.



McNeil HP et al : Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation; β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4120-4124.

Miyakis S. et al: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost* 2005, 3: 1-12.













Sorice M et al : Anticardiolipin and anti β_2 -GPI are two distinct populations of autoantibodies. *Thromb Haemost* 1996, 75: 393-398.

Roubey RA et al : Anticardiolipin autoantibodies recognize β_2 -glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of antigen density and bivalent binding. *J Immunol* 1995, 154: 954-960.

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	ANTIBODY DETECTION		INCUBATION CONDITIONS
		IgG	IgM	
INCUBATION OF SAMPLES	100µL	Dilution buffer: Blank reagent		30 min at room temperature
		Standards (double)		
		Diluted control (double)		
		Diluted samples		
WASHING	Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well)			
 Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.				
INCUBATION OF CONJUGATES	100µL	Anti-IgG Perox -ready to use-	Anti-IgM Perox -ready to use-	30 min at room temperature
WASHING	Wash 3 times with dilution and washing buffer (300µL/well)			
 Dry the microplate by tapping it gently on an absorbent paper to eliminate the excess liquid.				
ENZYME REACTION	100µL	Substrate solution ABTS		30 min at room temperature
STOP REACTION	100µL	Stop solution H ₂ SO ₄ (0.25M)		

SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity		Number of test
	ELISA Test		Consult Instructions
	In Vitro 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

