

ELISIS CARDIOLIPIN IgG / IgM

REF LIS 1204



DÉFINITION

Le coffret **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM** ([bmd](#)) permet une recherche qualitative et quantitative, par méthode ELISA, des anticorps anti-cardiolipine d'isotype IgG et/ou IgM dans le sérum humain. Les anticorps anti-cardiolipine reconnaissent principalement les épitopes spécifiques du complexe cardiolipine / β 2-glycoprotéine I qui apparaissent uniquement quand la β 2-glycoprotéine I interagit avec la cardiolipine.

Les résultats obtenus avec le coffret **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM** ([bmd](#)) associés à des examens complémentaires et au contexte clinique, constituent pour le clinicien un élément important dans le diagnostic et l'évaluation du risque de thrombose pour les patients ayant un Lupus Erythémateux Disséminé (LED).

Le coffret **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM** ([bmd](#)) peut être utilisé avec l'automate de dilution/répartition **CARISTM**.

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 thromboembolique 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 pontage aorto-coronarien. 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 par un allongement du temps de céphaline avec activateur.
- ✓ 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, une anti-mitochondrie 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.

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

La cardiolipine liée à la β 2-glycoprotéine I humaine est adsorbé sur un support solide constitué de 12 barrettes de 8 micropuits en polystyrène.


- Dans un premier temps, l'échantillon à tester est dilué puis mis à incuber dans les puits de la microplaque. S'il contient les anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer aux antigènes correspondants. Après incubation, les anticorps non fixés sont éliminés par lavage.
- Un conjugué monoclonal anti-IgG ou anti-IgM humaine couplé à la peroxydase de Raifort est ensuite rajouté à chaque puits. Il 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 : TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine). Au cours de celle-ci, se développe une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans l'échantillon.
- L'addition de HCl (1 M) permet de bloquer la réaction enzymatique.
- La lecture des densités optiques à 450nm sur un spectrophotomètre constitue la dernière étape de réalisation du test.
- L'intensité de la coloration du chromogène est proportionnelle à la quantité de conjugué liée au complexe anticorps-antigène et donc proportionnelle à la concentration initiale en autoanticorps du patient.


ECHANTILLONS

- Le test doit être réalisé sur du sérum. Utiliser de préférence des échantillons de sérum fraîchement prélevés. Les prélèvements doivent suivre les recommandations nationales.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximums. Au-delà, ils devront être congelés à -20°C.
- 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.

RÉACTIFS

Microplaque de 96 puits sensibilisés avec de la cardiolipine purifiée (origine bovine) liée à de la β 2-glycoprotéine I humaine (12x8 puits individuels sécables) MP	12 barrettes
1 flacon d'Etalon Seuil (bouchon bleu: solution jaune) contenant du sérum humain dilué et de l'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>Prêt à l'emploi</u> CONTROL REF	1 x 1,5ml
6 flacons de Calibrateur (intensité de couleur croissante en fonction de la concentration : solution jaune) contenant du sérum humain dilué et de l'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>Prêt à l'emploi</u> CAL	6 x 1,5ml
1 flacon de Contrôle Positif (bouchon rouge: solution jaune) contenant du sérum humain dilué et de l'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>Prêt à l'emploi</u> CONTROL +	1 x 1,5ml
1 flacon de Contrôle Négatif (bouchon vert: solution jaune) contenant du sérum humain dilué et de l'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>Prêt à l'emploi</u> CONTROL -	1 x 1,5ml
1 flacon de Conjugué anti- IgG- humaine couplé à la peroxydase (bouchon bleu: solution bleue) <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ IgG	1 x 15ml
1 flacon de Conjugué anti- IgM- humaine couplé à la peroxydase (bouchon vert: solution verte) <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ IgM	1 x 15ml
1 flacon de Substrat TMB (bouchon noir) composé de TMB/H ₂ O ₂ stabilisé. <u>Prêt à l'emploi</u> SUBS TMB	1 x 15ml
1 flacon de Diluant échantillon – concentré x5 (bouchon blanc: solution jaune) composé de Tris, de NaCl, de sérum albumine bovine et d'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>A diluer</u> DIL SPE 5x	1 x 20ml
1 flacon de Tampon de Lavage – concentré x50 (bouchon blanc: solution verte) composé de Tris, de NaCl, de Tween 20 et d'azide de sodium < 0.1% (agent de conservation) <u>A diluer</u> BUF WASH 50x	1 x 20ml
1 flacon de Solution d'arrêt (bouchon blanc: solution incolore) contenant HCl (1M) <u>Prêt à l'emploi</u> SOLN STOP	1 x 15ml

Les coffrets **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM** () sont calibrés à partir des sérums de références définis par N.E. Harris, Louisville. Les résultats sont exprimés en unités GPL/ml pour les IgG et en unités MPL/ml pour les IgM.

De plus, les coffrets **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM** () sont standardisés par rapport aux standards SAPPORO : HCAL pour les IgG et EY2C9 pour les IgM, sérums de référence du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) à Atlanta.

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Les réactifs et les barrettes de puits sensibilisés 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.
- Après la première ouverture, conserver tous les réactifs entre +2°C et +8°C.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Eau purifiée (selon les exigences de la Pharmacopée des Etats Unis ou de la Pharmacopée européenne)
- Lecteur de microplaque avec filtre de 450nm et filtre de référence optionnel de 620nm (600-690nm)
- Eprouvettes (100-1000ml)
- Tubes à hémolyse pour les dilutions de sérum
- Vortex
- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 10 μ l à 1000 μ l ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 100 μ l à 1000 μ l
- Laveur de microplaque (pipettes répétitives ou pipettes multicanaux ou système automatisé capables de délivrer précisément 300 μ l)
- Papier absorbant

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

L'ensemble des réactifs doit être préparé extemporanément.

1. Préparation de la Solution "Diluant d'échantillon"

- Diluer la Solution « Diluant d'échantillon » concentré au 1/5 en eau distillée.
Ex: 20ml dans 80ml
- Durée de conservation : 1 mois entre +2°C et +8°C.

2. Préparation du tampon de lavage

- Diluer le tampon de lavage concentré au 1/50 en eau distillée.
Ex: 20ml dans 980ml
- Préparer 20ml de tampon de lavage dilué pour 8 puits ou 200ml pour 96 puits.
- Durée de conservation : 1 mois entre +2°C et +8°C.

3. Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons au 1/101 dans la solution de Diluant d'échantillon (x1).
Ex: 1000 μ l de Diluant d'échantillon (1x) + 10 μ l de sérum
- Agiter vigoureusement au vortex.

4. Etape de lavage

- ❖ Lavage automatisé :
- Pour le calcul du volume de tampon de lavage, prendre en considération les volumes nécessaires pour la préparation des instruments ainsi que les volumes morts des pipettes.

❖ Lavage manuel :

- Vider les puits par retournement de la plaque.
- Tamponner vigoureusement la plaque retournée sur un papier absorbant.
- Distribuer 300µl de tampon de lavage dilué (x1) dans chaque puits et attendre 20 secondes.
- Répéter entièrement la procédure deux fois.

5. **Microplaques**

- Déterminer le nombre de puits exact nécessaire au test.
- Replacer les puits, non utilisés à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet déshydratant et les remettre immédiatement entre +2°C et +8°C.

PRÉCAUTIONS

Ramener tous les réactifs et les échantillons impérativement à température ambiante (+18°C/+25°C) avant utilisation.

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

Ne pas fumer, ne pas manger ou boire en manipulant le kit.

Ne pas pipeter à la bouche.

L'étalon seuil, les calibrateurs et les contrôles sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-VIH 1 et 2, anti-VCH et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. Toutefois s'agissant de produits potentiellement infectieux, il est nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

Ce coffret contient des composants potentiellement dangereux qui ne sont pas classifiés comme irritant pour les yeux et la peau. Toutefois, il est recommandé d'éviter le contact avec les yeux et la peau et de porter des gants jetables.

L'étalon seuil, les calibrateurs, les contrôles et les tampons contiennent moins de 0.1% (w/v) d'azide de sodium. 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 et de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.

Le coffret **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM** ([bmd](#)) 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.

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM ([bmd](#)) 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.

Ne pas mélanger, ni substituer les réactifs ou microplaques de lots différents, car cela pourrait entraîner des variations de résultats.

Incubation: pour les systèmes automatisés, il est recommandé de réaliser le protocole à +30°C.

Ne jamais exposer les réactifs à une température supérieure à + 37°C.

Pipeter toujours le Substrat et le Conjugué avec des cônes non souillés.

Protéger le Substrat de la lumière.

MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation du test

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

Retirer le nombre exact de puits nécessaires et replacer les puits non utilisés dans la pochette de protection avec le sachet déshydratant.

Utilisation d'une courbe d'étalonnage pour une interprétation quantitative

Pour chaque série d'essais, prévoir en double:

- Calibrateurs (Cal A, Cal B, Cal C, Cal D, Cal E et Cal F)
- Contrôle positif (Ctrl +)
- Contrôle négatif (Ctrl -)
- Echantillon dilué (S)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal A	Cal E	S1	S9								
B	Cal A	Cal E	S2	S10								
C	Cal B	Cal F	S3	S11								
D	Cal B	Cal F	S4	S12								
E	Cal C	Ctrl +	S5	S13								
F	Cal C	Ctrl +	S6	S14								
G	Cal D	Ctrl -	S7									
H	Cal D	Ctrl -	S8									

Utilisation de l'Etalon Seuil pour une interprétation qualitative

Pour chaque série d'essais, prévoir en double:

- Contrôle négatif (Ctrl -)
- Etalon seuil (Ctrl Ref)
- Contrôle positif (Ctrl +)
- Echantillon dilué (S)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl -	S3	S11	S19								
B	Ctrl -	S4	S12	S20								
C	Ctrl Ref	S5	S13	S21								
D	Ctrl Ref	S6	S14	S22								
E	Ctrl +	S7	S15	S23								
F	Ctrl +	S8	S16	S24								
G	S1	S9	S17									
H	S2	S10	S18									

2. Incubation des échantillons

Déposer 100µl d'étalon seuil et 100µl des contrôles négatif et positif dans les puits identifiés.

Déposer 100µl d'échantillons dilués.

Incuber 30 minutes à température ambiante (+20°C/+32°C)

Etape de lavage:

Vider les puits par retournement de la microplaque.

Procéder à une série de 3 lavages en tampon de lavage (300µl/puits).

3. Incubation du conjugué

Déposer 100µl de conjugué dans tous les puits.
Incuber 30 minutes à température ambiante (+20°C/+32°C)

Etape de lavage:

Vider les puits par retournement de la microplaque.
Procéder à une série de 3 lavages en tampon de lavage (300µl/puits).

4. Incubation du substrat

Déposer 100µl de substrat TMB dans tous les puits.
Incuber 30 minutes à température ambiante (+20°C/+32°C)
Protéger les puits de la lumière intense.

5. Arrêt de la réaction

Déposer 100µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
Incuber au minimum 5 minutes.
Agiter délicatement la microplaque pendant 5 secondes.

6. Lecture

Lire la densité optique de chaque puits à 450nm (des filtres 450/620nm peuvent être éventuellement utilisés) au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Pour une interprétation quantitative, tracer la courbe d'étalonnage sur du papier logarithmique en portant en ordonnées (axe des Y) les DO de chaque calibrateur et en abscisses (axe des X) leurs valeurs correspondantes en GPL/ml ou MPL/ml. Afin d'obtenir de meilleurs résultats, bmd recommande d'utiliser les courbes log (x) / lin (y) et 4 paramètres d'ajustement. A partir de la courbe et de la densité optique obtenue pour chaque échantillon, déduire la concentration en anticorps en GPL/ml ou MPL/ml.

	Résultats négatifs	Résultats positifs
IgG	< 15 GPL/ml	> 15 GPL/ml
IgM	< 15 MPL/ml	> 15 MPL/ml

Exemple de courbe d'étalonnage

Il est recommandé de tester les calibrateurs au cours de chaque série d'essais.

Calibrateurs IgG	DO 450/620nm	CV % (Variation)
0 GPL/ml	0,066	3,2
3 GPL/ml	0,162	0,4
10 GPL/ml	0,291	1,7
30 GPL/ml	0,597	1,3
100 GPL/ml	1,101	2,9
300 GPL/ml	2,039	0,4

Exemple de calcul

Patient	DO (en double)	Moyenne (DO)	Résultat (GPL/ml)
P01	0,772/0,752	0,762	48,8
P02	1,058/1,038	1,048	82,9

Ne pas utiliser cet exemple pour interpréter vos résultats !

Les données spécifiques de chaque lot sont indiquées dans les certificats d'analyse joints.

Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de ses techniques, de ses contrôles, de ses équipements et de sa population de patients.

Pour une interprétation qualitative, lire la densité optique de l'étalon seuil et des échantillons patients. Comparer la densité optique obtenue pour les échantillons patients à celle de l'étalon seuil. Les échantillons patients ayant une densité optique supérieure à celle de l'étalon seuil sont considérés positifs.

DO Patient < DO étalon seuil	=> Négatif
DO Patient > DO étalon seuil	=> Positif

Le diagnostic clinique définitif ne doit pas être uniquement basé sur les résultats obtenus avec ce test, mais il doit résulter de l'interprétation du contexte clinique et des examens complémentaires. Différentes méthodes de diagnostic doivent être associées pour établir le diagnostic définitif.

CONTROLE QUALITÉ

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

bmd propose des contrôles multiparamétriques externes qui peuvent être testés en parallèle (IMMUNO-TROL I, réf : HM036 ; IMMUNO-TROL II, réf : HM037). Ces contrôles sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

Sensibilité, spécificité et concordance

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM (bmd) a été comparé à 1 coffret ELISA commercialisé.

L'étude a porté sur 111 échantillons cliniquement définit.

- ⇒ 28 Lupus Erythémateux Disséminé (LED)
- ⇒ 36 arthrites rhumatoïdes
- ⇒ 19 syndromes anti-phospholipide primaire
- ⇒ 15 syndromes anti-phospholipide secondaire
- ⇒ 3 connectivites
- ⇒ 3 poly neuropathies
- ⇒ 1 vascularite cérébrale, 1 p-ANCA, 1 Syndrome de Sjögren, 1 ischémie neurologique transitoire, 1 fibromyalgie, 1 polyangite et 1 hypertension

Résultats

		Kit commercial CARDIOLIPINE IgG	
		+	-
ELISIS CARDIOLIPIN IgG	+	42	1
	-	4	64

Sensibilité relative : 91.3%
Spécificité relative : 98.5%
Concordance : 95.5%

		Kit commercial CARDIOLIPINE IgM	
		+	-
ELISIS CARDIOLIPIN IgM	+	18	1
	-	22	70

Sensibilité relative : 45%
Spécificité relative : 98,6%
Concordance : 79,3%

Résultats discordants

Diagnostic clinique	
IgG	- 3 patients avec syndrome anti-phospholipide primaire - 1 patient avec une maladie autre - 1 patient avec syndrome anti-phospholipide secondaire
IgM	- 5 patients avec arthrite rhumatoïde - 5 patients avec Lupus Erythémateux Disséminé (LED) - 6 patients avec syndrome anti-phospholipide primaire - 3 patients avec syndrome anti-phospholipide secondaire - 4 patients avec une autre maladie

Parmi les échantillons discordants en IgM, 9 patients présentent un diagnostic clinique (arthrite rhumatoïde et autre maladie) qui laisse supposer que le kit commercial concurrent utilisé, dans cette évaluation, présente des faux positifs.

Précision du test

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

ELISIS CARDIOLIPIN IgG		ELISIS CARDIOLIPIN IgM	
Intra-essai (24 tests dans le même essai)		Intra-essai (24 tests dans le même essai)	
Titres moyens (GPL/ml)	CV (%)	Titres moyens (MPL/ml)	CV (%)
586,2	1,5	499,8	0,9
67,4	3,4	68,9	1,7
34,5	7,6	40,7	4,6

ELISIS CARDIOLIPIN IgG		ELISIS CARDIOLIPIN IgM	
Inter-essais (18 tests dans 3 essais différents)		Inter-essais (18 tests dans 3 essais différents)	
Titres moyens (GPL/ml)	CV (%)	Titres moyens (MPL/ml)	CV (%)
156,2	0,4	110,2	0,7
37,0	0,8	24,0	0,7
11,4	2,6	11,8	2,7

Seuil de positivité

Estimé sur 40 échantillons issus de donneurs sains.

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM	
Seuil de positivité : valeur moyenne + 3 écart-types	15 GPL/ml Ou 15 MPL/ml

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.

Anti-cardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations.

Clin. Rheum. 1989, 8 : 475-785

HESS D.C.

Anti-cardiolipin antibodies: a study of frequency in TIA and stroke.

Neurology 1991, 23 (suppl) : 129-132

INFANTE RIVARD C. et al.

Lupus anticoagulant, anti-cardiolipin 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.













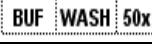
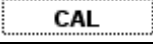




BMD Editions (1999).

SCHEMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	RÉACTIFS		CONDITIONS D'INCUBATION
		MÉTHODE QUANTITATIVE	MÉTHODE QUALITATIVE	
INCUBATION	100µl	Calibrateurs A, B, C, D, E et F (en double)	Contrôle négatif (en double)	30 min à TA
	100µl	Contrôle positif (en double)	Etalon seuil (en double)	
	100µl	Contrôle négatif (en double)	Contrôle positif (en double)	
	100µl	Echantillons dilués (en double)	Echantillons dilués (en double)	
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de lavage (300µl/puits)			
INCUBATION DU CONJUGUÉ	100µl	Conjugué anti-IgG-HRP humaine OU Conjugué anti-IgM-HRP humaine		30 min à TA
LAVAGE	Laver 3 fois en tampon de lavage (300µl/puits)			
RÉACTION ENZYMATIQUE	100µl	Substrat TMB		30 min à TA À protéger de la lumière intense
ARRÊT DE LA RÉACTION	100µl	Solution d'arrêt (1M HCl)		5 min

TA : température ambiante (+20°C/+32°C)

SYMBOLES UTILISÉS

	Risques biologiques		Limites de température		Référence catalogue
	Consulter les instructions d'utilisation		Dispositif médical de diagnostic in vitro		Code du lot
	Nombre de tests		A utiliser jusque		Déclaration de conformité CE
	Diluant échantillon		Solution Stop		Etalon de référence
	Tampon de lavage		Calibrateur		Microplaque
	Contrôle		Substrat		Conjugué

BioMédical Diagnostics SA

Siège Social

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



ELISIS CARDIOLIPIN IgG / IgM

REF LIS 1204



English

DEFINITION

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit ([bmd](#)) is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the qualitative and quantitative determination of IgG and/or IgM anti-cardiolipin antibodies in human serum samples. Anti-cardiolipin antibodies mainly recognize specific epitopes on a complex composed of cardiolipin and β 2-glycoprotein I which are only expressed when β 2-glycoprotein I interacts with cardiolipin.

The results of the **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit** ([bmd](#)) are to be used in conjunction with the clinical findings and the other laboratory tests to aid in the diagnosis and risk estimation of thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit ([bmd](#)) may be used with the **CARIS™ system** (diluting and dispensing device).

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 pathologies are Systemic Lupus Erythematosus, drug-induced lupus, thromboembolic disease, 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 IgM, or 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.

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

Highly purified cardiolipin bound to the native human β 2-glycoprotein I is coated onto a polystyrene microtiter plate (12 strips of 8 wells).

- First, the diluted sample is added to the coated well, which allows to bind. After incubation, unbound proteins are removed by washing.
- Then, a monoclonal anti-human IgG or IgM conjugated to horseradish peroxidase is added to each well. The conjugate binds to the antigen-antibody complex. After incubation, the excess conjugate is removed by a second wash.
- The chromogenic step is performed by the addition of TMB substrate (3,3',5,5' – tetramethylbenzidine). During this step, a colour will develop in proportion to the amount of antibodies in the sample.
- Addition of Stop Solution HCl (1 M) serves to stop the enzymatic reaction.
- After stopping the reaction by HCl (1 M) the optical density is read by a spectrophotometer at 450nm
- The rate of color formation from the chromogen is a function of the amount of conjugate bound to the antigen-antibody complex and this is proportional to the initial concentration of the respective antibodies in the patient sample.

SAMPLES COLLECTION AND HANDLING

- The test should be performed on serum. Use preferentially freshly collected serum samples. Blood withdrawal must follow national requirements.
- 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.

REAGENTS

96 wells microplate coated with highly purified cardiolipin (bovin origin) bound to native human β 2-glycoprotein I (12x8 individual breakaway microwells) MP	12 strips
1 vial of Cut-off Calibrator (capped blue: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use CONTROL REF	1 x 1.5mL
6 vials of Calibrators (color increasing with concentration: yellow solution) 0, 3, 10, 30, 100, 300 GPL/mL or MPL/mL containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use CAL	6 x 1.5mL
1 vial of Positive control (capped red: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use CONTROL +	1 x 1.5mL
1 vial of Negative control (capped green: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use CONTROL -	1 x 1.5mL
1 vial of anti-human IgG-HRP Conjugate (capped blue: blue solution) Ready to use CONJ IgG	1 x 15mL
1 vial of anti-human IgM-HRP Conjugate (capped green: green solution) Ready to use CONJ IgM	1 x 15mL
1 vial of TMB Substrate (capped black) Containing: stabilized TMB/H ₂ O ₂ Ready to use SUBS TMB	1 x 15mL
1 vial of Sample Diluent - 5x concentrated (capped white: yellow solution) containing: Tris, NaCl, BSA, sodium azide < 0.1% (preservative) To dilute DIL SPE 5x	1 x 20mL
1 vial of Wash Buffer - 50x concentrated (capped white: green solution) Containing: Tris, NaCl, Tween 20, sodium azide < 0.1% (preservative) To dilute BUF WASH 50x	1 x 20mL
1 vial of Stop Solution (capped white: colorless solution) containing: 1M Hydrochloric Acid) Ready to use SOLN STOP	1 x 15mL

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit (μ md) is calibrated against reference sera from N.E. Harris, Louisville. The results are expressed in GPL/mL for IgG and in MPL/mL for IgM.

In addition, **ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit** (μ md) is standardized using the Sapporo-Standards: HCAL for IgG and EY2C9 for IgM, reference sera from the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) Atlanta.

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

- Purified water (according to the definition of the United States Pharmacopeia and the European Pharmacopeia)
- Microtiter plate reader 450nm reading filter and optional 620 nm reference filter (600-690nm)
- Glass ware (cylinder 100-1000mL)
- Test tubes for serum dilutions
- Vortex mixer
- Precision pipettes (10, 100, 200, 500, 1000 μ L) or adjustable multipipette (100-1000 μ L)
- Microplate washing device (300 μ L repeating or multichannel pipette or automated System)
- Adsorbent paper

SETUP

All the reagents should be prepared as required:

1. Preparation of Sample Diluent solution

- Dilute concentrated Sample diluent 1/5 in distilled water.
 Ex: 20mL plus 80mL
- Storage period: 1 month at +2°C/+8°C.

2. Preparation of wash buffer

- Dilute concentrated Wash buffer 1/50 in distilled water.
 Ex: 20mL plus 980mL
- Prepare 20mL of diluted wash buffer for 8 wells or 200mL for 96 wells
- Storage period: 1 month at +2°C/+8°C.

3. Preparation of samples

- Dilute to 1/101 in Sample diluent (1x)
 Ex: 1000 μ L sample buffer (1x) + 10 μ L serum
- Shake vigorously at the vortex.

4. Washing Step

- ❖ Automated washing:
- Consider excess volumes required for setting up the instrument and dead volume of robot pipette.

❖ Manual washing:

- Discard liquid from wells by inverting the plate.
- Knock the microwell frame with wells downside vigorously on clean adsorbent paper.
- Pipette 300µL of diluted wash buffer into each well, wait for 20 seconds.
- Repeat the whole procedure twice again.

5. Microplates

- Calculate the number of wells required for the test.
- Remove unused wells from the frame, replace and store in the provided plastic bag, together with desiccant, seal tightly (+2°C/+8°C).

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 smoke, eat or drink when manipulating the kit.

Do not pipette by mouth.

Human sources for the preparation of calibrators 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.

This kit contains potentially hazardous components. Though kit reagents are not classified being irritant to eyes and skin we recommend to avoid contact with eyes and skin and wear disposable gloves.

Calibrators, Controls and Buffers 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.

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit ([bmd](#)) has been developed according CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC relating to the classification, packaging and labeling of dangerous preparations.

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit ([bmd](#)) 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.

Do not mix or substitute reagents or microplates from different lot numbers. This may lead to variations in the results.

Incubation: We recommend test performance at +30°C for automated Systems.

Never expose components to higher temperature than +37°C.

Always pipette Substrate and Conjugate with brand new tips only.

Protect Substrate from light.

METHOD

1. Preparing the test

Use the work sheet to note the sample locations.

Detach the exact number of wells needed and return unused wells to plastic pouch provided in the kit, with the desiccant bag.

For quantitative interpretation use calibrators to establish a standard curve

Set out in duplicate:

- Calibrators (Cal A, Cal B, Cal C, Cal D, Cal E and Cal F)
- Positive control (Ctrl +)
- Negative control (Ctrl -)
- Diluted samples (S)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal A	Cal E	S1	S9								
B	Cal A	Cal E	S2	S10								
C	Cal B	Cal F	S3	S11								
D	Cal B	Cal F	S4	S12								
E	Cal C	Ctrl +	S5	S13								
F	Cal C	Ctrl +	S6	S14								
G	Cal D	Ctrl -	S7									
H	Cal D	Ctrl -	S8									

For qualitative interpretation use cut-off calibrators

Set out in duplicate:

- Negative control (Ctrl -)
- Cut-off calibrator (Ctrl Ref)
- Positive control (Ctrl +)
- Diluted samples (S)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl -	S3	S11	S19								
B	Ctrl -	S4	S12	S20								
C	Ctrl Ref	S5	S13	S21								
D	Ctrl Ref	S6	S14	S22								
E	Ctrl +	S7	S15	S23								
F	Ctrl +	S8	S16	S24								
G	S1	S9	S17									
H	S2	S10	S18									

2. Sample incubation

Add 100µL of calibrators OR cut-off calibrator and controls into the designated microwells

Add 100µL of diluted samples.

Incubate for 30 minutes at room temperature (+20°C/+32°C)

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion.

Wash 3 times with 300µL of washing buffer.

3. Incubation of conjugate

Add 100µL of conjugate

Incubate for 30 minutes at room temperature (+20°C/+32°C)

Wash step:

Remove the contents of the wells by rapid inversion

Wash 3 times with 300µL of washing buffer

4. Incubation of substrate

Add 100µL TMB substrate into each well

Incubate for 30 minutes at room temperature (+20°C/+32°C)

Protect the wells from intense light

5. Stop solution

Add 100µL of Stop solution to each well

Incubate for 5 minutes minimum

Agitate plate carefully for 5 sec.

6. Reading

Read the optical density of each well at 450 nm (optionally 450/620nm) within 30 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

For **quantitative interpretation** establish the standard curve by plotting the **optical density (OD) of each calibrator (y-axis)** with respect to the corresponding concentration values in **GPL/mL** or **MPL/ mL (x-axis)**. For best results bmd recommend log (x) / lin (y) coordinates and 4-Parameter Fit. From the OD of each sample, read the corresponding antibody concentrations expressed in **GPL/mL** or **MPL/mL**.

	Negative results	Positive Results
IgG	< 15 GPL/mL	> 15 GPL/mL
IgM	< 15 MPL/mL	> 15 MPL/mL

Example of a standard curve

We recommend pipetting calibrators in parallel for each run.

Calibrators IgG	OD 450/620 nm	CV % (Variation)
0 GPL/ml	0.066	3.2
3 GPL/ml	0.162	0.4
10 GPL/ml	0.291	1.7
30 GPL/ml	0.597	1.3
100 GPL/ml	1.101	2.9
300 GPL/ml	2.039	0.4

Example of calculation

Patient	Replicate (OD)	Mean (OD)	Result (GPL/mL)
P01	0.772/0.752	0.762	48.8
P02	1.058/1.038	1.048	82.9

Do not use this example for interpreting patients results!

For lot specific data, see enclosed quality control certificate.

Each laboratory should establish its own normal range based upon its own techniques, controls, equipment and patient population according to their own established procedures.

For **qualitative interpretation** read the optical density of the cut-off calibrator and the patient samples. Compare patient's OD with the OD of the cut-off calibrator. All samples which are higher than cut-off are considered positive.

Negative:	OD Patient < OD cut-off
Positive:	OD Patient > OD cut-off

A definite clinical diagnosis should not be based on the results of the performed test only, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated. The diagnosis is to be verified using different diagnostic methods.

LIMITATION

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration 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 and negative controls concentration should fall within the range printed on the quality control certificate. If either reagent control is invalid, the test should be repeated.

bmd offers an external multiparameter quality control (IMMUNO-TROL I, Cat: HM036; IMMUNO-TROL II, Cat: HM037). These controls should be handled as samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

Sensitivity, specific affinity and agreement to other methods

ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM kit (bmd) has been compared to one marketed ELISA kit.

The study was performed on 172 samples of:

⇒ 28 Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

⇒ 36 Rheumatoid arthritis

⇒ 19 primary APS

⇒ 15 secondary APS

⇒ 3 connective tissue disease

⇒ 3 polyneuropathy

⇒ 1 cerebral vasculitis, 1 p-ANCA, 1 Sjögren syndrome, 1 prolonged reversible ischemic neurological deficiency, 1 fibromyalgia, 1 polyangiitis et 1 hypertension.

Results

		CARDIOLIPINE IgG Marketed kit	
		+	-
ELISIS CARDIOLIPIN IgG	+	42	1
	-	4	64

Relative sensibility : 91.3%
Relative specificity : 98.5%
Accuracy : 95.5%

		CARDIOLIPINE IgM		
		Marketed kit		
		+	-	
ELISIS CARDIOLIPIN IgM	+	18	1	Relative sensibility : 45% Relative specificity : 98.6% Accuracy : 79.3%
	-	22	70	

Discordant results

		Clinical diagnostic
IgG		- 3 patients with primary APS - 1 patient with other disease - 1 patient with secondary APS
IgM		- 5 patients with rheumatoid arthritis - 5 patients with SLE - 6 patients with primary APS - 3 patients with secondary APS - 4 patients with other disease

Among the IgM discordant samples, 9 patients present a clinical diagnosis (rheumatoid arthritis and other disease) which lets suppose that the concurrant marketed kit used, in this evaluation, present false positives.

Test precision

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

ELISIS CARDIOLIPIN IgG		ELISIS CARDIOLIPIN IgM	
Intra-assay (24 tests in a same assay)		Intra-assay (24 tests in a same assay)	
Titer mean (GPL/mL)	CV (%)	Titer mean (MPL/mL)	CV (%)
586.2	1.5	499.8	0.9
67.4	3.4	68.9	1.7
34.5	7.6	40.7	4.6

ELISIS CARDIOLIPIN IgG		ELISIS CARDIOLIPIN IgM	
Inter-assays (18 tests in 3 differents assays)		Inter-assays (18 tests in 3 differents assays)	
Titer mean (GPL/mL)	CV (%)	Titer mean (MPL/mL)	CV (%)
156.2	0.4	110.2	0.7
37.0	0.8	24.0	0.7
11.4	2.6	11.8	2.7

Threshold value

Calculated on 40 samples from « healthy subjects ».

	ELISIS CARDIOLIPIN IgG/IgM
Cut-off : Mean value +3SD	15 GPL/mL Or 15 MPL/mL

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.

Anti-cardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations.

Clin. Rheum. 1989, 8 : 475-785

HESS D.C.

Anti-cardiolipin antibodies: a study of frequency in TIA and stroke.

Neurology 1991, 23 (suppl) : 129-132

INFANTE RIVARD C. et al.

Lupus anticoagulant, anti-cardiolipin 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
		QUANTITATIVE METHOD	QUALITATIVE METHOD	
INCUBATION OF SAMPLES	100µL	Calibrators A, B, C, D, E and F (in duplicate)	Negative Control (in duplicate)	30 min at RT
	100µL	Positive Control (in duplicate)	Cut-off calibrator (in duplicate)	
	100µL	Negative Control (in duplicate)	Positive Control (in duplicate)	
	100µL	Diluted samples (in duplicate)	Diluted samples (in duplicate)	
WASHING	Wash 3 times with washing buffer (300µL/ well)			
INCUBATION OF CONJUGATE	100µL	Anti-human IgG-HRP conjugate OR Anti-human IgM-HRP conjugate		30 min at RT
WASHING	Wash 3 times with washing buffer (300 µL/ well)			
ENZYME REACTION	100µL	TMB Substrate		30 min at RT protected from intense light
STOP REACTION	100µL	Stop solution (1M HCl)		5 min

RT: room temperature (+20°C/+32°C)

SYMBOLS USED

	Biological risks		Temperature limitation		Catalogue Number
	Consult instructions for use		In Vitro Diagnostic Medical Device		Batch Code
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Sample Diluent		Stop Solution		Cut-off calibrator
	Wash Buffer		Calibrator		Microplate
	Control		Substrate		Conjugate

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

