




ELISIS APS Profile IgG / IgM

REF LIS 1234 

DÉFINITION

Le coffret **ELISIS APS Profile IgG/IgM** () permet une recherche qualitative, par méthode ELISA, de 8 anticorps anti-Prothrombine (Facteur II), anti-Thrombine, anti-Cardiolipine, anti-Phosphatidyl-sérine, anti-Phosphatidyl-inositol, anti-Phosphatidyl-éthanolamine, anti-Phosphatidyl-choline et anti-Sphingomyéline dans le sérum humain.

Les résultats obtenus avec le coffret **ELISIS APS Profile IgG/IgM** () 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 APS Profile IgG/IgM** () peut être utilisé avec l'automate de dilution/répartition **CARISTM**.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les Phospholipides sont les composants des membranes biologiques. Les anticorps anti-phospholipides sont spécifiques des phospholipides comme la Cardiolipine, le Phosphatidyl-inositol, la Phosphatidyl-éthanolamine, la Phosphatidyl-choline et la Sphingomyéline. Ces anticorps sont fréquemment identifiés chez les patients ayant un lupus érythémateux disséminé (LED) et des maladies autoimmunes associées. Il s'agit alors du syndrome des anticorps anti-phospholipides secondaire. A l'inverse, le syndrome des anticorps anti-phospholipides primaire est caractérisé par la présence d'anticorps anti-phospholipides chez des patients n'ayant aucune autre maladie auto-immune.

De nombreuses études ont montré une corrélation entre ces autoanticorps et l'apparition de thrombose, de thrombocytopenie et d'avortements (dû à un infarctus placentaire). Le mécanisme exact de la thrombose induite par les anticorps anti-phospholipides n'est pas encore entièrement identifié.

Pour les patientes atteintes du syndrome des anti-phospholipides, la présence isolée des anticorps anti-Prothrombine a été récemment identifiée comme fortement associée aux avortements spontanés. Les anticorps anti-Prothrombine sont les premiers marqueurs de cette complication sérieuse alors que les autres anticorps anti-phospholipides n'ont pas été reliés aux pertes fœtales.

La présence d'anticorps anti-Thrombine a été associée aux caractéristiques cliniques du syndrome anti-phospholipides. Ils semblent être corrélés avec la thrombose veineuse profonde.

PRINCIPE DU TEST

Chacun des 8 phospholipides hautement purifiés (Prothrombine, Thrombine, Cardiolipine, Phosphatidyl-sérine, Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-éthanolamine, Phosphatidyl-choline et Sphingomyéline) est adsorbé individuellement 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 au moins l'une des spécificités recherchées, les autoanticorps impliqués vont se fixer à un ou plusieurs 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.

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.

RÉACTIFS

Microplaque de 96 puits sensibilisés individuellement avec 8 phospholipides hautement purifiés (Prothrombine, Thrombine, Cardioline, Phosphatidyl-sérine, Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-éthanolamine, Phosphatidyl-choline et Sphingomyéline) (12x8 puits individuels sécables) MP	12 barrettes
8 flacons d'Etalon Seuil (bouchon blanc: 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	8 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 -	2 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

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)
- Epprouvettes (100-1000ml)
- Tubes à hémolyse pour les dilutions de sérum
- Vortex
- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 10µl à 1000µl ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 100µl à 1000µl
- Laveur de microplaque (pipettes répétitives ou pipettes multicanaux ou système automatisé capables de délivrer précisément 300µl)
- 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: 1000µl de Diluant d'échantillon (1x) + 10µl 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 et le contrôle 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, le contrôle 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 APS Profile 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 APS Profile 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 OPÉRATEUR

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 de l'Étalon Seuil pour une interprétation qualitative

Pour chaque série d'essais, prévoir en double :

- Etalon seuil (Ctrl Ref)
- Contrôle négatif (Ctrl -)
- Échantillon dilué (S)

2. Incubation des échantillons

Déposer 100µl d'étalon seuil et 100µl du contrôle négatif dans les puits identifiés.

Déposer 100µl d'échantillons dilués.

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

Étape 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)

Étape 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

Lire la densité optique de l'étalon seuil et des échantillons patients. Multiplier l'Étalon seuil par le coefficient spécifique au paramètre, indiqué dans le certificat d'analyse spécifique à chaque lot. Comparer la densité optique obtenue pour les échantillons patients à celle de l'Étalon seuil pour le paramètre à calculer. Les échantillons patients ayant une densité optique supérieure à celle de l'étalon seuil sont considérés positifs.

DO de l'Étalon seuil x coefficient spécifique à l'antigène = DO seuil pour le paramètre

DO Patient < DO étalon seuil pour le paramètre => **Négatif**

DO Patient > DO étalon seuil pour le paramètre => **Positif**

Etalon Seuil et Contrôles	DO 450/620nm
Contrôle négatif	0,034
Etalon seuil	0,450

Exemple d'interprétation

Il est recommandé de tester l'Etalon seuil au cours de chaque série d'essais.

Coefficient pour le paramètre Cardiolipine = 1,0

DO Etalon seuil pour le paramètre Cardiolipine = 0,450 x 1.0 = 0,550

DO Echantillon patient = 0,999 > 0,450 = positif

Ne pas utiliser cet exemple pour interpréter vos résultats !

[bmd](#) recommande de retester les échantillons équivoques.

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 semi-quantitative, chaque valeur de densité optique peut être exprimée en index. L'index est calculé en divisant la densité optique de l'échantillon patient par celle obtenue pour l'étalon seuil :

$$\frac{\text{DO (Echantillon patient)}}{\text{DO (Etalon seuil)}} = \text{Index}$$

Index < 1.0	=> Négatif
Index > 1.0	=> 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.

LIMITES

Les sérums hémolysés, lipémiques, ictériques ou bactériologiquement contaminés peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

CONTROLE QUALITÉ

Le coffret contient un contrôle négatif. Il est conseillé de le doser au cours de chaque série réalisée.

[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.

Boey, M.L., Colaco, C.B., Gharavi, A.E., et al. (1983):

Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Br. Med. J. 287: 1021-1023.

Gastineau, D.A., Kazmier, F.J., Nichols, W.L., Bowie, E.J. (1985):

Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. Am. J. Hematol. 19:265-267.

P. von Landenberg, T. Matthias, J. Zaech, M. Schultz, M. Lorber, M. Blank, Y. Shoenfeld (2003).

Antiprothrombin antibodies are associated with pregnancy loss in patients with the antiphospholipid syndrome.

Am J Reprod Immunol 49: 51-56.

Wöhrle R, Matthias T, von Landenberg P, Oppermann M, Helmke K, Förger F (2000):

Clinical relevance of antibodies against different phospholipids.

Journal of Autoimmunity 15: A60.

Wöhrle R, Matthias T, von Landenberg P, Oppermann M, Förger F, Helmke K (2000):

A new anti-phospholipid-antibody ELISA - sensitivity and specificity for cerebrovascular insults in autoimmune diseases.

Journal of Autoimmunity Vol 15: A 60.











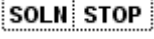

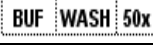



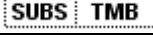

BIBLIOGRAPHIE

SCHEMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	RÉACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATION
INCUBATION	100µl 100µl 100µl	Etalon seuil Contrôle négatif Echantillons dilués	30 min à TA
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 APS Profile IgG / IgM

REF LIS 1234



DEFINITION

ELISIS APS Profile IgG/IgM kit ([bmd](#)) is an enzyme linked immunoassay (ELISA) for the individual qualitative IgG and/or IgM screening of 8 antibodies against Prothrombin, Thrombin, Cardiolipin, Phosphatidyl-serine, Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-ethanolamin, Phosphatidyl-choline and Sphingomyelin in human serum samples.

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

DIAGNOSTIC VALUE

Antibodies against phospholipids, components of the biological membranes, are specific for phospholipids such as Cardiolipin, Phosphatidyl -inositol, -ethanolamine, -choline and Sphingomyelin.

Anti-phospholipid antibodies are frequently found in sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and related diseases. The occurrence of anti-phospholipid antibodies in patients with SLE and related diseases is typical for a secondary anti-phospholipid syndrome (APS). In contrast, anti-phospholipid antibodies in patients with no other autoimmune diseases characterize the primary APS.

Many studies have shown a correlation between these autoantibodies and an enhanced incidence of thrombosis, thrombocytopenia and habitual abortions (as a consequence of placental infarct). The exact mechanisms by which pathogenic anti-phospholipid antibodies induce thrombosis is not yet revealed fully.

Antibodies targeting prothrombin alone have recently been described being highly associated with fetal loss in APS patients. Prothrombin antibodies are the the first marker for this serious complication as all other known antiphospholipid antibodies failed to correlate with fetal loss.

The presence of anti-thrombin antibodies has been associated with the clinical features of the antiphospholipid syndrome (APS). Anti-Thrombin antibodies seem to correlate with deep venous thrombosis.

ASSAY PRINCIPLE

8 highly purified phospholipids (Prothrombin, Thrombin, Cardiolipin, Phosphatidyl-serine, Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-ethanolamin, Phosphatidyl-choline and Sphingomyelin) are individually 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.

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.

REAGENTS

96 wells microplate individually coated with 8 highly purified phospholipids (Prothrombin, Thrombin, Cardiolipin, Phosphatidyl-serine, Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-ethanolamin, Phosphatidyl-choline and Sphingomyelin) <input type="checkbox"/> MP (12x8 individual breakaway microwells)	12 strips
8 vials of Cut-off Calibrator (capped white: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) <input type="checkbox"/> CONTROL <input type="checkbox"/> REF Ready to use	8 x 1.5mL
1 vial of Negative control (capped green: yellow solution) containing: human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative) Ready to use <input type="checkbox"/> CONTROL <input type="checkbox"/> -	2 x 1.5mL
1 vial of anti-human IgG-HRP Conjugate (capped blue: blue solution) Ready to use <input type="checkbox"/> CONJ <input type="checkbox"/> IgG	1 x 15mL
1 vial of anti-human IgM-HRP Conjugate (capped green: green solution) Ready to use <input type="checkbox"/> CONJ <input type="checkbox"/> IgM	1 x 15mL
1 vial of TMB Substrate (capped black) containing: stabilized TMB/ H ₂ O ₂ Ready to use <input type="checkbox"/> SUBS <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> DIL <input type="checkbox"/> SPE <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> BUF <input type="checkbox"/> WASH <input type="checkbox"/> 50x	1 x 20mL
1 vial of Stop Solution (capped white: colorless solution) containing: 1M Hydrochloric Acid Ready to use <input type="checkbox"/> SOLN <input type="checkbox"/> STOP	1 x 15mL

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 620nm reference filter (600-690nm)
- Glass ware (cylinder 100-1000mL)
- Test tubes for serum dilutions
- Vortex mixer
- Precision pipettes (10, 100, 200, 500, 1000µL) or adjustable multipipette (100-1000µL)
- Microplate washing device (300µL 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: 1000µL sample buffer (1x) + 10µL 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 calibrator and control 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.

Calibrator, Control 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 APS Profile 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 APS Profile 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 qualitative interpretation use cut-off calibrators

Set out in duplicate:

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

2. Sample incubation

Add 100µL of cut-off calibrator and control 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 450nm (optionally 450/620nm) within 30 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

Read the optical density of the cut-off control and the patient samples. Multiply the OD of the cut-off calibrator by the parameter specific factor, provided with the lot specific QC certificate. Compare patient ODs with the calculated parameter OD cut-off value. All samples which are higher than cut-off are considered positive.

OD Cut-off calibrator x antigen specific factor = OD Cut-off parameter.

Negative: OD Patient < OD cut-off

Positive: OD Patient > OD cut-off

Calibrators	OD 450/620 nm
Negative Control	0.034
Cut-off Calibrator	0.450

Example of interpretation

We recommend pipetting cut-off calibrator in parallel for each run.

Cardiolipin Factor= 1.0

OD Cut-off calibrator 0.450 x 1.0 = 0.550

OD patient 0.999 > 0.450 = positive

Do not use this example for interpreting patients results!

[bmd](#) recommend to retest samples that are equivocal.

For lot specific data, see enclosed quality control leaflet.

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 **semi-quantification of the results**, each patient-OD value can be expressed by the Index-Value. The Index-Value is calculated by dividing the patient-OD by the cut-off OD:

$$\text{Index Value} = \frac{\text{OD (patient sample)}}{\text{OD (cut-off calibrator)}}$$

Negative => Index Value < 1.0

Positive => Index Value > 1.0

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 a negative control. The negative control should be included with each run of the test.

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

REFERENCES

Boey, M.L., Colaco, C.B., Gharavi, A.E., et al. (1983):

Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Br. Med. J. 287: 1021-1023.

Gastineau, D.A., Kazmier, F.J., Nichols, W.L., Bowie, E.J. (1985):

Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. Am. J. Hematol. 19:265-267.

P. von Landenberg, T. Matthias, J. Zaech, M. Schultz, M. Lorber, M. Blank, Y. Shoenfeld (2003).

Antiprothrombin antibodies are associated with pregnancy loss in patients with the antiphospholipid syndrome.

Am J Reprod Immunol 49: 51-56.

Wöhrle R, Matthias T, von Landenberg P, Oppermann M, Helmke K, Förger F (2000):

Clinical relevance of antibodies against different phospholipids.

Journal of Autoimmunity 15: A60.

Wöhrle R, Matthias T, von Landenberg P, Oppermann M, Förger F, Helmke K (2000):

A new anti.phospholipid-antibody ELI SA - sensitivity and specificity for cerebrovascular insults in autoimmune diseases.














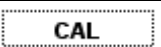


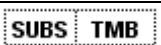
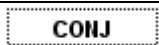
Journal of Autoimmunity Vol 15: A 60.

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
INCUBATION OF SAMPLES	100µL 100µL 100µL	Cut-off calibrator (in duplicate) Negative Control (in duplicate) Diluted samples (in duplicate)	30 min at RT
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 (300µL/ 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 risk		Temperature limitation		Catalog Number
	Read instructions for use		In Vitro Diagnostic Use		Lot Number
	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

