

FIDIS™ APS

REF MX 012 IgG 

REF MX 013 IgM 

DEFINITION

Le coffret **FIDIS™ APS** ([bmd](#)) constitue une méthode d'identification semi-quantitative d'autoanticorps sur supports particuliers utilisant un système de détection par cytométrie de flux. Il permet la recherche simultanée de 3 spécificités: **cardiolipine**, **β_2 -glycoprotéine I (β_2 -GPI)** et **prothrombine ou Facteur II (FII)**.

✦ Le coffret **FIDIS™ APS IgG** ([bmd](#)) permet la recherche simultanée des autoanticorps humains d'isotype IgG.

✦ Le coffret **FIDIS™ APS IgM** ([bmd](#)) permet la recherche simultanée des autoanticorps humains d'isotype IgM.

Les coffrets **FIDIS™ APS** ([bmd](#)) peuvent être utilisés 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 thrombo-embolique et les thromboses en général, les avortements à répétition, les cytopénies périphériques autoimmunes, la cirrhose biliaire primitive, certaines infections aiguës, les infections par rétrovirus, SIDA et HTLV. Les anticorps anti-cardiolipine, à l'exception des infections où leur présence est d'ailleurs transitoire, semblent avoir une valeur prédictive pour les thromboses. Ils aggravent le pronostic vital dans l'infarctus du myocarde et augmentent le risque de rejet du greffon utilisés lors des pontages. Le terme de "syndrome des anticorps anti-cardiolipine" a été proposé pour désigner les manifestations morbides associées à ces anticorps.

La recherche des autoanticorps anti- β_2 -GPI permet d'accroître la valeur prédictive du risque thrombotique dans les pathologies autoimmunes et corrélées à la survenue d'un syndrome des anti-phospholipides. Les autoanticorps sont dirigés contre une protéine plasmatique de 50kDa nommée β_2 -GPI. Elle est 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.

Les anticorps anti-prothrombine appartiennent au groupe des anticorps anti-phospholipides spécifiques des phospholipides chargés négativement (composants les membranes biologiques et la prothrombine).

La présence d'anticorps anti-phospholipides est associée au Syndrome des anti-phospholipides (SAP). De nombreuses études ont montré une corrélation entre la présence de ces autoanticorps et l'apparition de thromboses, de thrombocytopenies et d'avortements (dû à un infarctus placentaire).

Le mécanisme exact de la thrombose induite par les anticorps antiphospholipides n'est pas encore entièrement identifié.

Les **critères de classification du Syndrome des anti-phospholipides (SAP)** ont été révisés en 2006.

Les critères recommandés par le consensus International de Sydney sont :

1. La détection simultanée des anticorps anti-Cardiolipine et des anticorps anti- β_2 -GPI (IgG et/ou IgM).
2. La présence d'anticorps anti-Cardiolipine (IgG et/ou IgM) à un titre moyen ou élevé (c'est-à-dire >40GPL ou MPL, ou > au 99^{ème} percentile), au minimum en 2 occasions et pendant 12 semaines.
3. La présence d'anticorps anti- β_2 -GPI (IgG et/ou IgM) au 99ème percentile, au minimum en 2 occasions et pendant 12 semaines.

PRINCIPE DU TEST

FIDIS™ APS ([bmd](#)) repose sur l'utilisation de microsphères de taille uniforme différemment colorées et d'un cytomètre de flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre de flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement un laser excite la fluorescence d'un composé secondaire pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

Chaque antigène nécessaire à la réalisation du test est couplé à une catégorie de microsphères colorées.

Les différentes catégories sont ensuite mélangées pour constituer le réactif final, support des réactions immunologiques spécifiques avec les différents autoanticorps recherchés.

Le coffret **FIDIS™ APS IgG** ([bmd](#)) permet la détection des autoanticorps d'isotype IgG anti-cardiolipine, anti- β_2 -GPI et anti-prothrombine.

Le coffret **FIDIS™ APS IgM** ([bmd](#)) permet la détection des autoanticorps d'isotype IgM anti-cardiolipine, anti- β_2 -GPI et anti-prothrombine.

Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.

- Au cours d'une première étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères sensibilisées par les antigènes cardioline, β 2-GPI et FII. Si l'échantillon contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer au(x) antigène(s) correspondant(s), sur les différentes catégories de microsphères.

- Après incubation, une étape de lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.

- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les **immunoglobulines humaines d'isotype IgG ou IgM** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.

- Une étape finale de lavage stoppe la réaction et permet d'éliminer les anticorps conjugués non liés.

- La réaction est alors mesurée par le cytomètre de flux qui identifie chaque type de microsphères et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.

- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité arbitraire (UA/ml) pour les spécificités β 2-GPI et prothrombine et en unités standardisées (GPL/ml ou MPL/ml) pour la spécificité cardioline.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 5 μ l à 1000 μ l.
- Pipette multicanaux ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 40 μ l à 300 μ l ou 5 μ l à 2 ml.
- Agitateur
- Papier absorbant
- Pipettes sérologiques
- Chronomètre
- Films pour microplaques
- Sonicateur

ÉCHANTILLONS

- Utiliser du sérum.
- Éviter 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 maximum. 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.

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser un coffret dont la date de péremption est dépassée.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

COMPOSITION DU COFFRET

Plaque de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle MP	1 plaque
Flacon (A) de 3 catégories de microsphères colorées sensibilisées par les antigènes : <i>Cardioline synthétique, β2GPI humaine purifiée et Prothrombine humaine purifiée.</i> <i>Lyophilisées</i> (à reconstituer avec le tampon D) MICROSPHERES	qsp 6 ml
Flacon (B3) tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) <i>Prêt à l'emploi</i> DIL SPE	2 x 115ml
Flacon de calibrateur* <i>Prêt à l'emploi</i> CAL <i>Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.</i>	1 x 1,5 ml
Flacon de contrôle positif* donnant une réactivité standardisée et constituant un témoin de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai <i>A diluer</i> CONTROL + <i>Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.</i>	1 x 250 μ l
Flacon de contrôle négatif <i>A diluer</i> CONTROL -	1 x 250 μ l
Flacon de conjugué anti-IgG ou anti-IgM humaines couplées à la phycoérythrine <i>Prêt à l'emploi.</i> CONJ IgG CONJ IgM	1 x 12 ml
Flacon (C3) de tampon de lavage (flacon noir) <i>Prêt à l'emploi</i> BUF WASH	1 x 100 ml
Flacon (D) de tampon de reconstitution des microsphères <i>Prêt à l'emploi</i> BUF MICROSPHERES	1 x 6ml

Les titres* du calibrateur sont exprimés en unités arbitraires par ml (UA/ml) excepté pour la cardioline.

Le titre* du calibrateur pour la spécificité cardioline est exprimé en GPL/ml ou MPL/ml en référence aux standards SAPPORO : HCAL (IgG) et EY2C9 (IgM).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs en solutions 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.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.
- Les coffrets **FIDIS™ APS** (**bmd**) ont été élaborés 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.
- Les coffrets **FIDIS™ APS** (**bmd**) ont été optimisés 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.

- Les contrôles et le calibrateur 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 coffrets FIDIS™ APS (bmd) ne peuvent pas être utilisés en multi-batch avec les autres coffrets de la gamme FIDIS™.

PREPARATION DES TESTS

Préparation de l'unité de filtration FIDIS™

☞ Vérifier les tuyaux reliant la pompe au support et le réglage du manomètre (molette totalement fermée).

Utilisation du système d'analyse FIDIS™ et du logiciel MLX-BOOSTER

☞ Se reporter au Manuel d'utilisation fourni avec le système FIDIS™ pour effectuer les étapes de mise en route et de calcul. Pour toutes informations complémentaires et/ou résolution de problèmes, veuillez prendre contact auprès de bmd ou votre distributeur.

1. Commencer la série comme indiquée dans le Manuel d'utilisation.

N.B : L'appareil met 30 minutes pour chauffer après l'avoir allumé. Un nouveau préchauffage est nécessaire après 4 heures d'inactivité du système.

2. Les étapes de calibration et de contrôles sont décrites dans le Manuel d'utilisation. Ces 2 étapes devront être exécutées régulièrement 1 fois/mois et à chaque nouveau lot de « Sheath fluid » afin d'assurer une performance optimale de l'appareil. L'étape de calibration doit également être effectuée si la température indiquée sur l'écran de la série du lot est en dehors de celle paramétrée.

3. Programmer un lot ou une série de lots multiples sur FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.

4. Placer la microplaque dans le support de plaques du système FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.

5. Effectuer l'analyse des résultats comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.

6. A la fin de la dernière utilisation journalière de l'appareil, exécuter les opérations de lavage et de désinfection avant d'arrêter le système d'analyse conformément aux instructions d'arrêt décrites dans le Manuel d'utilisation.

Préparation des réactifs

☞ Ramener l'ensemble des réactifs à température ambiante (+18°C/+25°C) avant de les préparer extemporanément.

1. Préparation des microsphères

- Reconstituer la solution de microsphère en ajoutant tout le flacon D de tampon de reconstitution des billes au flacon A. Attendre 5 minutes et vortexer.

- Durée de conservation après reprise : 2 mois entre +2°C et +8°C.

2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons et les contrôles au 1/101 dans le tampon de dilution (B3).

Exemple : 10µl d'échantillon dans 1000µl de tampon de dilution (B3).

- **Agiter vigoureusement au vortex.**

3. Définition de la configuration du test

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

a. Prévoir systématiquement :

- ✦ 1 puits « blanc réactif »
- ✦ 1 puits pour le contrôle négatif
- ✦ 1 puits pour le contrôle positif
- ✦ 2 puits « calibrateur »

b. Détermination du nombre exact de puits nécessaires et de leur attribution

Les schémas qui suivent donnent 2 exemples de configuration selon le nombre de puits nécessaires et la disponibilité en puits vierges. Le sens du dépôt doit s'effectuer systématiquement par colonne sans intercaler de puits vides.

Une même plaque peut être utilisée au cours de différents essais si les puits non utilisés sont protégés par des films pour microplaque. Un même puits ne peut être réutilisé plusieurs fois.

Afin d'éviter toute erreur dans ce sens, il est conseillé d'identifier les puits déjà usagés (voir exemple 2 ci-dessous).

c. Programmation du protocole d'analyses au niveau du FIDIS™

☞ Se reporter au manuel d'utilisation FIDIS™

« Programmation d'un batch ou d'un Multibatch. ».

Exemple 1 :

- la plaque est totalement vierge : l'attribution des puits débute en A1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	E4	E12	E20								
B	Ctrl-	E5	E13	E21								
C	Ctrl+	E6	E14	E22								
D	Cal	E7	E15	E23								
E	Cal	E8	E16	E24								
F	E1	E9	E17	E25								
G	E2	E10	E18									
H	E3	E11	E19									

- 16 puits ont déjà été utilisés : l'attribution des puits débute en A3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Blanc	E4	E12	E20	E28	E36	E44	E52		
B			Ctrl-	E5	E13	E21	E29	E37	E45	E53		
C			Ctrl+	E6	E14	E22	E30	E38	E46			
D			Cal	E7	E15	E23	E31	E39	E47			
E			Cal	E8	E16	E24	E32	E40	E48			
F			E1	E9	E17	E25	E33	E41	E49			
G			E2	E10	E18	E26	E34	E42	E50			
H			E3	E11	E19	E27	E35	E43	E51			

MODE OPERATOIRE

1. Distribution des microsphères

- Protéger les puits non utilisés avec des films plastiques (si nécessaire).
- Déposer 50µl de microspheres dans chaque puits, **après avoir préalablement agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20s.**

REMARQUE :

☉ Dans le cadre de l'utilisation de l'automate CARIS™, une sonication des microsphères de 5 minutes est préconisée.

☉ Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, les étapes 1 et 2 doivent être inversées :

⇒ distribuer le sérum dilué puis les microsphères

2. Incubation des échantillons

- Déposer 100µl de tampon de dilution (**B3**) pour le blanc réactif.
- Déposer 100µl de contrôles dilués, de calibrateur prêt à l'emploi et d'échantillons dilués.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation en recouvrant la plaque et en évitant de la laisser sous la lumière directe.

3. Lavage 1

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 2 cycles successifs en tampon de lavage (**C3**) :

- Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
- Distribuer 300µl de tampon de lavage (**C3**).
- Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
- Distribuer 300µl de tampon de lavage (**C3**).
- Déclencher la pompe. Après aspiration totale du liquide, compter 5 secondes supplémentaires, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
- Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.
- Repositionner la plaque sur le laveur et filtrer à nouveau 5 secondes. Arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
- Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- Placer ensuite la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué.

4. Incubation du conjugué

- Déposer 100µl de conjugué

- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation, en recouvrant la plaque et en évitant de la placer sous la lumière directe. Le temps d'incubation débute après que le conjugué ait été ajouté à tous les puits. Si ce temps n'est pas respecté, les résultats pourront être erronés.

Remarque : le conjugué est sensible à la lumière
⇒ Refermer le flacon après utilisation.

5. Lavage 2

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 1 cycle en tampon de dilution (**B3**) :

Utiliser de préférence deux réservoirs à réactifs distincts pour les lavages 1 et 2.

Ou bien nettoyer et sécher correctement le réservoir entre les deux lavages afin de ne pas mélanger les deux tampons B3 et C3.

- Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
 - Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide par ouverture du robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
 - Distribuer 100µl de tampon de dilution (**B3**).
 - Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
 - Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
 - Distribuer 100µl de tampon de dilution (**B3**) et procéder à l'analyse de la microplaque.
En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée **dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B3)**. Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.
- ### 6. Analyse
- ☞ L'effectuer conformément au manuel d'utilisation **FIDIS™** et **MLX BOOSTER™**.

CRITERES DE VALIDATION DES RESULTATS

Le calibrateur, les contrôles positif et négatif doivent être testés dans chaque série d'essai pour s'assurer que tous les réactifs et procédures ont été exécutés correctement.

Afin de valider les résultats, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être rencontrés. En cas de non-conformité d'un de ces critères, le test devra être considéré comme non valide et l'analyse devra être refaite.

- La valeur du contrôle positif doit être comprise dans les limites de celles indiquées sur les étiquettes des flacons correspondants.
- La valeur du contrôle négatif doit être inférieure à 10 UA/ml, 10 GPL/ml ou 10 MPL/ml.

La solution de microspheres contient des billes témoins permettant de vérifier la présence de sérum dans les puits, ainsi que le bon déroulement du test.

Un puits présentant un signal-réponse non conforme sera invalidé par le logiciel MLX BOOSTER™.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Unités arbitraires (UA/ml) <i>Excepté pour la cardioliopine</i>	< 10	10 - 15	> 15
Interprétation	Négatif	Limite*	Positif

Unités standardisées (GPL/ml ou MPL/ml) pour la cardioliopine	< 10	10 - 15	> 15
Interprétation	Négatif	Limite*	Positif

(* Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

Classification Clinique proposée

Conformément au consensus international de Sydney (S. MIYAKIS, 2006), le seuil de positivité du coffret **FIDIS™ APS** (bmd), a été établi par le 99^{ème} percentile de la distribution des valeurs d'une population normale. Un niveau moyen à élevé associé à une manifestation clinique est relevant.

Sur la base de l'évaluation interne du coffret **FIDIS™ APS** (bmd), bmd propose la classification suivante :

≤15 GPL/ml or MPL/ml (99 ^{ème} percentile)	16 to 39 GPL/ml or MPL/ml	40 to 80 GPL/ml or MPL/ml	> 80 GPL/ml or MPL/ml
Niveau normal	Niveau faible	Niveau moyen	Niveau élevé

Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs normales et pathologiques de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.

CALCUL DES RESULTATS

Les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

LIMITES

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

Les sérums de patients immunodéprimés donneront un résultat non valide.

CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour les différentes spécificités. Les contrôles multiparamétriques Immunotrol I & II (bmd, réf.: HM036 et HM037) renferment des anticorps humains dirigés contre les spécificités recherchées. Ils

sont à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTERISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

SENSIBILITE, SPECIFICITE, CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES METHODES

FIDIS™ APS (bmd) a été comparé à 2 coffrets ELISA commerciaux :

L'étude a porté sur un maximum de 130 échantillons

Résultats

FIDIS APS IgG				
Spécificité antigénique	Nbre échantillons	Sensibilité relative (%)	Spécificité relative (%)	Concordance (%)
Cardioliopine	85	95,5	88,9	94,1
β2GPI	85	90,0	92,7	91,8
Prothrombine	82	100,0	94,8	95,1

FIDIS APS IgM				
Spécificité antigénique	Nbre échantillons	Sensibilité relative (%)	Spécificité relative (%)	Concordance (%)
Cardioliopine	130	94,4	95,5	95,4
β2GPI	128	90,0	96,6	96,1
Prothrombine	67	100,0	96,9	97,0

Mode de détermination du seuil de positivité

Estimé à partir des 400 échantillons issus des populations « individus sains » et « interférences biologiques »

Les seuils de positivité (15UA/ml ou 15GPL/ml ou 15 MPL/ml) correspondent au 99^{ème} percentile de la distribution des valeurs pour l'ensemble des 3 spécificités.

Les seuils de négativité (10UA/ml ou 10GPL/ml ou 10 MPL/ml) correspondent au 96^{ème} percentile pour l'ensemble des 3 spécificités.

Entre ces 2 seuils, les échantillons sont considérés douteux.

FIDELITE DU TEST

	Intra-essai (10 tests dans un même essai)		
	CV%	IgG	IgM
CARDIO	Valeur faible	8,2	9,9
	Valeur haute	1,3	11,5
β2GP1	Valeur faible	11,4	7,8
	Valeur haute	6,4	10,3
FII	Valeur faible	7,7	12,4
	Valeur haute	6,1	6,9

	Inter-essai (5 essais différents)		
	CV%	IgG	IgM
CARDIO	Valeur faible	14,6	13,7
	Valeur haute	13,0	16,4
β2GP1	Valeur faible	18,0	10,5
	Valeur haute	12,0	10,0
FII	Valeur faible	3,8	9,5
	Valeur haute	11,4	3,8

BIBLIOGRAPHIE

ABUAF N. et al.

Vers une standardisation du dosage des anticorps anti-cardiolipine. *STV* 1993, 5 : 663-671

BAS DE LAAT H., et al.

Pathogenic anti-B2GP1 antibodies recognize domain I of B2GP1 only after a conformational change. *Blood* 2006 ; 107:1916-1924.

BEVER E.M.

Cofacteurs involved in the antiphospholipid syndrome. *Editorial. Lupus* 1992, 1 : 51-53

CHAMLEY L.W., et al

Conformationally altered B2GP1 is the antigen for anti-cardiolipin antibodies. *Clin Exp Immunol* 1999 ; 115:571-576

DE GROOT P.G., et al.

Anti-prothrombin antibodies and their relation with thrombosis and lupus anticoagulant. *Lupus* 7 : suppl2, S32, 1998

FONT J.

Anti-cardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations. *Clin. Rheum.* 1989, 8 : 475-785

GALLI M., et al.

Antiprothrombin antibodies : detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrom. *Blood* 1999 ; 93:2149.

HESS D.C.

Anti-cardiolipin antibodies: a study of frequency in TIA and stroke. *Neurology* 1991, 23 (suppl) : 129-132

ICHIKAWA K., et al.

A chimeric antibody with the human gamma1 region as a putative standard for assays to detect IgG B2GP1 dependent anti-cardiolipin and anti-B2GP1 antibodies. *Arthritis Rheum* 42 (1999) 2461-2470.

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).













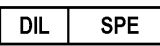

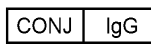

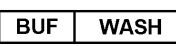




MIYAKIS S. et al.

International consensus statement on a update of the classification criteria for definite anti-phospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost* 2006, 4:295-306.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITE A DISTRIBUER	REACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits			
Incubation des échantillons	100µl	Tampon de dilution (B3): blanc réactif	30 min. Température ambiante
	100µl	Contrôle négatif dilué 1/101	
	100µl	Contrôle positif dilué 1/101	
	100µl	Calibrateur (en double)	
	100µl	Échantillons dilués 1/101	
Lavage 1	Laver 2 fois au tampon de lavage (C3) (300µl/puits)		
Incubation du conjugué	100µl	Anti-IgG ou anti-IgM Prêt à l'emploi	30 min Température ambiante
Lavage 2	Laver 1 fois avec du tampon de dilution (B3) (100µl/puits)		
Lecture	Ajouter 100µl/puits de tampon de dilution (B3) et analyser par insertion de la plaque dans le cytomètre de flux. <i>En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B3). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.</i>		

LEGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conservé à		Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Déclaration de conformité CE
	Microplaque		Contrôle négatif		Microspheres
	Diluant échantillon		Contrôle positif		Conjugué IgG
	Calibrateur		Tampon de lavage		Tampon de reconstitution des microsphères
	Test FIDIS		Contient de l'azide de sodium		A reconstituer

BioMédical Diagnostics SA

Siège social
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tél : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com



FIDIS™ APS

REF **MX 012** **IgG** 

REF **MX 013** **IgM** 

INTENDED USE

The **FIDIS™ APS** ([bmd](#)) kit is a semi-quantitative homogeneous fluorescent-based microparticles immunoassay using flow cytometry readings. It is designed for the simultaneous detection of 3 autoantibodies specificities: cardiolipin, β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) and prothrombin also called Factor II (FII).

✦ **FIDIS™ APS IgG** ([bmd](#)) kit is designed for the detection of human IgG isotype antibodies

✦ **FIDIS™ APS IgM** ([bmd](#)) kit is designed for the detection of human IgM isotype antibodies

The **FIDIS™ APS** kits can be used with a dispensing/diluting device, the **CARIS™ system**.

SUMMARY AND EXPLANATION

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.

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 aminoacids.

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.

Antibodies targeting prothrombin alone have recently been described being highly associated with fetal loss in APS patients.

Prothrombin antibodies are the first marker for this serious complication as all other known antiphospholipid antibodies failed to correlate with fetal loss.

Laboratory criteria of anti-phospholipid syndrome (APS) classification were revised in 2006 and recommendations of the Sydney international consensus are :

1. Determination of both anti-cardiolipin and anti- β_2 -GPI antibodies (IgG and/or IgM) in serum or plasma.
2. Presence of anti-cardiolipin antibodies (IgG and/or IgM) in medium or high titer (**i.e. >40GPL or MPL, or > the 99th percentile**), on two or more occasions, at least 12 weeks apart.
3. Presence of anti- β_2 -GPI antibodies (IgG and/or IgM) in titer > the 99th percentile, on two or more occasions, at least 12 weeks apart.

ASSAY PRINCIPLE

FIDIS™ APS ([bmd](#)) kits are based on the use of distinct uniform size color-coded microspheres and a benchtop flow cytometer interfaced to digital signal processing hardware and software. A red diode laser beam in the flow cytometer classifies each set of microspheres on the basis of its unique fluorescence intensity (red to orange) thus identifying which analyte is being tested. At the same time, a green laser beam illuminates the external second molecule fluorescence to quantify the reaction related to the specific analyte.

Each antigen required for the assay is covalently coupled to an individual set of microspheres through its surface functional groups.

The different antigen coupled microspheres are mixed together, constituting the final microsphere reagent.

FIDIS™ APS IgG ([bmd](#)) kits allow the detection of 3 IgG specificities of: anti-cardiolipin, anti- β_2 -GPI and anti-prothrombin autoantibodies.

FIDIS™ APS IgM ([bmd](#)) kits allow the detection of 3 IgM specificities of: anti-cardiolipin, anti- β_2 -GPI and anti-prothrombin autoantibodies.

The test is performed in a 96 well microplate with a filtering membrane at the bottom of the wells.

- In the first step, the sample is distributed in each well containing the microspheres mixture. If this sample contains one or more of the suspected antibodies, this(ese) antibody(ies) bind to the corresponding antigen(s) on the various sets of microspheres.

- After incubation, a wash step using a filtration process removes the unbound antibodies.

- A phycoerythrin labeled **anti-human IgG or IgM conjugate** is then added that binds to the previously bound antibodies.

- A final wash step allows to stop the reaction.

- The reaction is then directly measured by the flow cytometer, which differentiates each set of microspheres according to its fluorescence color while simultaneously measuring the average fluorescence emitted by the conjugate.

- A calibration system allows of each sample by interpolation the determination of the titer (AU/mL) for β_2 -GPI and prothrombin specificities and in standardized unit (GPL/mL or MPL/mL) for cardiolipin specificity.

ADDITIONAL MATERIAL – NOT SUPPLIED

- Precision pipettes capable of accurately delivering 5 μ L to 1000 μ L
- Multichannel Pipettes or dispensers capable of accurately delivering 40 μ L to 300 μ L or 5 μ L to 2 mL
- Serological pipettes
- Laboratory timer to monitor incubation steps
- Ultrasonic bath - Absorbent towel
- Microplate sealing films - Vortex mixer

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

- The test is performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents in their original packaging at +2°C to +8°C.
- Do not freeze reagents.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- After use, store all components immediately back at +2°C to +8°C.

REAGENTS SUPPLIED

96 well microplate with filtering membrane and lid. MP	1 plate
Vial (A) of color-coded microsphere set sensitized by synthetic cardiolipin, human purified β_2 -GPI and human purified prothrombin antigen(s). <u>Lyophilized</u> (to be reconstituted with the buffer named D) MICROSPHERES	sq 6 mL
Vial (B3) of sample dilution buffer (white vial). <u>Ready to use</u> DIL SPE	2 x 115 mL
Vial of calibrator* <u>Ready to use</u> CAL <i>Each titer is printed on the vial label</i>	1 x 1,5 mL
Vial of positive control* concentrated. This control has a standard reactivity, which provides evidence of the proper reagents activity and proper assay performance. <u>To be diluted</u> CONTROL + <i>Expected values are printed on the vial label.</i>	1 x 250 μ L
Vial of negative control concentrated. <u>To be diluted.</u> CONTROL -	1 x 250 μ L
Vial of anti-human IgG or IgM coupled to phycoerythrin <u>Ready to use</u> CONJ IgG CONJ IgM	1 x 12 mL
Vial (C3) of washing buffer (black vial) <u>Ready to use</u> BUF WASH	1 x 100 mL
Vial (D) of reconstitution buffer for the microsphere set <u>Ready to use</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6mL

Calibrator titers are expressed in arbitrary units per ml (AU/ml) excepted for cardiolipin.*

Calibrator titers for cardiolipin are expressed in GPL/mL or MPL/mL referred to SAPPORO standard HCAL (IgG) and EY2C9 (IgM).*

CAUTION

- Reagents in 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.
- Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.
- The **FIDIS™ APS** ([bmd](#)) kits have been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC regarding classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
- The **FIDIS™ APS** ([bmd](#)) kits have been optimized for use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer reagents. Dilution or alteration of these reagents may also alter the performance of the test. Follow thoroughly the test procedure to insure optimal performance.
- *Calibrators and controls are from human origin. The human sera used in the preparation of these products were tested and found non-reactive for*

antibodies to HIV-1, HIV-2, anti-HCV and Hepatitis B antigen. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle as if capable of transmitting infectious diseases.

FIDIS™ APS (bmd) cannot be used in multibatch with the other FIDIS™ kits.

TESTS SET-UP

FIDIS™ Washer

☞ Check the tubing connecting the pump to the stand and the manometer setting (wheel completely closed).

Using FIDIS™ Analyzer and MLX-BOOSTER Software

☞ See the User's Manual provided with the **FIDIS™ Instrument** for detailed instructions on running the equipment and for calculation. For additional information and/or trouble shooting problems, please contact bmd subsidiaries or distributors.

1. Start the run as described in the User's Manual.
NOTE: The FIDIS™ takes 30 minutes to warm up after being turned on. A new warm up is necessary after 4 hours of system inactivity.
2. Calibration and controls are described in the User's Manual. Calibration and controls should be routinely performed once per month and each time a new lot of Sheath fluid reagent is used in order to insure optimal instrument performance.
Calibration should also be performed when the temperature is out of the determined range shown on the run batch screen.
3. Programming a batch or a multibatch of test protocol on the FIDIS™.
4. Load the microplate into the plate holder of the FIDIS™ as described in the User's Manual.
5. Analyze the results according the User's Manual.
6. When finished for the day, perform the sanitizing and soak operations, prior to turning the Analyzer off according to the shutting down procedure described in the User's Manual.

Reagents Preparation

☞ Remove the individual components from storage, **allow them to warm up to room temperature (+18°C to +25°C)**, and mix them well.

1. Microsphere preparation

- Reconstitute the microsphere solution by adding the vial **D** of reconstitution buffer to the vial **A** of lyophilized microspheres. Wait 5 minutes and vortex.
- Stable 2 months at +2°C to +8°C, after reconstitution.

2. Preparation of samples and controls.

- Dilute the samples and controls at **1:101** in dilution buffer (**B3**).
Ex.: 10µL sample in 1000µL dilution buffer (**B3**).
- **Vortex vigorously.**

3. Assay configuration

Use the work-sheet included in the kit to identify the location of the samples.

a. When setting up the test, systematically take into account the following well requirements: ⇨ See examples below

- ✦ 1 "reagent-blank" well
- ✦ 1 well for negative control
- ✦ 1 well for positive control
- ✦ 2 "calibrator" wells

b. Calculation of the correct number of wells necessary and their location.

In the following examples, 2 different configurations are described, according to the number of wells needed, and the availability of unused wells. The sample dispensing must be systematically carried out in a column. Do not leave empty wells.

The same microplate can be used for more than one series of tests if unused wells are protected by microplate sealing film. Any single well can only be used once.

To avoid any error in using a well more than once, identify the used wells with a marker (see example 2 below).

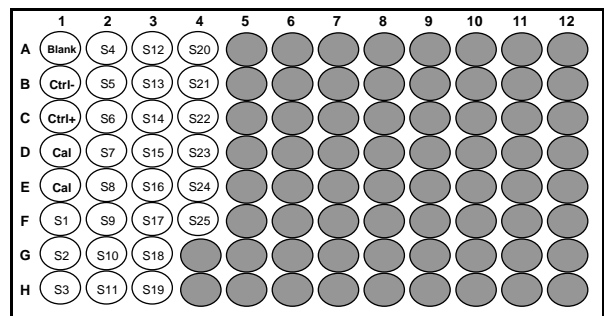
c. Programming of the test protocol on the FIDIS™

☞ Refer to the FIDIS™ user's manual:

"Creating a batch or a multi-batch".

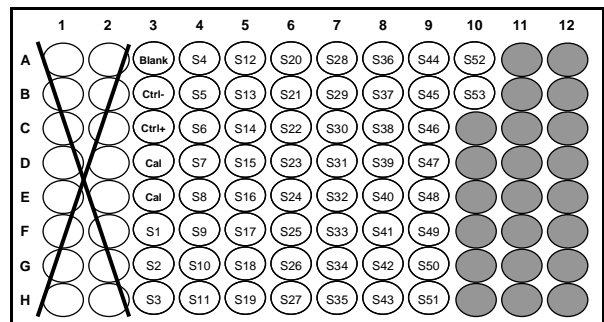
Example 1:

- The microplate is totally blank (no well has yet been used): Use A1 as the 1st well.



Example 2:

- 16 wells have already been used: Use A3 as the 1st well.



ASSAY PROCEDURE

1. *Microspheres dispensing*

- Before to start the assay and if it is necessary, protect the unused wells with a microplate sealing film.
- **Vortex the microspheres reagent vigorously for 20s** and dispense 50µL in each well to be used.

PLEASE NOTE:

- If **CARIS™** is used, the microspheres should be sonicated for 5 minutes.
- If a dispensing/diluting device is used (like **CARIS™**), the procedure steps 1 and 2 should be reversed:
⇒ dispense diluted sera in first and then, dispense microspheres

2. *Addition and Incubation of the samples*

- Dispense 100µL of sample dilution buffer (**B3**) for reagent blank.
- Dispense 100µL of prediluted controls, of ready to use calibrator and of prediluted samples.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature, away from direct sunlight and without shaking.

3. *Wash step 1*

Wash the plate 2 times with washing buffer (**C3**) using filtration unit:

- Remove the microplate lid (verify if the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed in totality and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.
- Dispense 300µL of washing buffer (**C3**) in all the used wells.
- Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.
- Dispense 300µL of washing buffer (**C3**) in all the used wells.
- Start the pump. Stop it after 5 additional seconds when all the buffer has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.
- Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by tapping vigorously the plate 10 times on an absorbent towel.
- Place again the microplate on the washer and start the pump for 5 seconds. Stop it and quickly open the vacuum break valve.
- Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting vigorously the plate on an absorbent towel.
- Place the plate on a totally dry surface before starting the conjugate incubation.

4. *Incubation of the conjugate*

- Dispense 100µL of ready to use conjugate in each well used.

- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature away from direct sunlight and without shaking. The incubation time starts after the conjugate has been added to all wells. If this timing is not followed, the results might be erroneous.

Note : the conjugate is photosensitive.
⇒ **After using, close the vial carefully.**

5. *Wash step 2*

Wash the plate using the filtration unit on 1 cycle with dilution buffer (**B3**).

Use two different reagent reservoirs for the 2 washing steps.

*Either clean and dry correctly the reservoir between both wash steps (avoid to mix both **B** and **C** buffers).*

- Remove the microplate lid (verify that the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- Dispense 100µL of dilution buffer (**B3**) in all the used wells.
- Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting the plate on an absorbent towel.
- Dispense 100µL of dilution buffer (**B3**) in all the used wells. Place the plate on a totally dry surface at room temperature.

The reading must be doing in the hour following adding the solution (B3). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.

6. *Reading of the test*

☞ Follow the **MLX-BOOSTER™** and **FIDIS™** user's manual: Processing batches.

VALIDATION CRITERIA OF THE RESULTS

Calibrator, negative and positive controls have to be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures performed properly.

In order to validate the results, all the criteria listed below must be met. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

- The positive controls should show a value within the limits printed on the corresponding vial labels.
- The negative controls should be less than 10 AU/mL or 10 GPL/mL or 10MPL/mL.

The microsphere set contains Internal standard beads allowing to verify the presence of serum in wells, as well as the good respect of the test procedure. Wells presenting a not corresponding fluorescent signal will be no valid with **MLX BOOSTER™** software.

INTERPRETATION OF RESULTS

Arbitrary Units (UA/ml) Except cardiolipin	< 10	10 - 15	> 15
Result	Negative	Equivocal*	Positive

Standardized units (GPL/ml ou MPL/ml) for cardiolipin	< 10	10 - 15	> 15
Result	Negative	Equivocal*	Positive

(*) Equivocal results should be controlled on a second sample and the interpretation of the results should be done in the frame of additional testing and taking into account the clinical status of the patient.

Proposed Clinical classification

As per the Sydney international consensus meeting guidelines (S MIYAKIS, 2006); the positive threshold of the **FIDIS™ APS** (bmd), was established by the 99th percentile of the values obtained for a normal population (400 samples from « blood donors » and « biological interferences » populations).

Based on the evaluation of the **FIDIS™ APS** (bmd), bmd proposes the following classification; where a medium to high level has the most relevant clinical association.

≤15 GPL/mL or MPL/mL (99 th percentile)	16 to 39 GPL/mL or MPL/mL	40 to 80 GPL/mL or MPL/mL	> 80 GPL/mL or MPL/mL
Normal Level	Low Level	Medium Level	High Level

Each laboratory should establish and maintain its own references normal and clinical range values, based on the patient population and other local factors.

CALCULATION OF RESULTS

☞ The results are automatically calculated by MLX-BOOSTER™ software and can be printed for each assay.

LIMITATION

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.

The serums from Immunodeficient patients will give a no valid result.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. Immunotrol I and II multiparametric controls (bmd, Cat. n° HM036 and HM037) contain human auto-antibodies directed against researched specificities.

To be assayed in the same manner as the unknown samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

SENSITIVITY, SPECIFICITY AND CONCORDANCE COMPARED TO OTHERS METHODS

FIDIS™ APS (bmd) has been compared to 2 marketed ELISA kits:

The study was performed on 130 samples

Results

FIDIS APS IgG				
Antigenic specificity	Number samples	Relative sensitivity (%)	Relative specificity (%)	overall agreement (%)
Cardiolipin	85	95.5	88.9	94.1
β ₂ GPI	85	90.0	92.7	91.8
Prothrombin	82	100.0	94.8	95.1

FIDIS APS IgM				
Antigenic specificity	Number samples	Relative sensitivity (%)	Relative specificity (%)	overall agreement (%)
Cardiolipin	130	94.4	95.5	95.4
β ₂ GPI	128	90.0	96.6	96.1
Prothrombin	67	100.0	96.9	97.0

Method for determining threshold values

Calculated on the 400 samples from « blood donors » and « biological interferences » populations, the positive threshold (15UA/mL or 15GPL/mL or 15MPL/mL) corresponds to the 99th percentile of the values distribution for the 3 specificities.

The negative threshold (10UA/mL or 10GPL/mL or 10MPL/mL) corresponds to the 96th percentile for the 3 specificities.

Between these threshold, results are considered equivocal.

REPRODUCIBILITY / PRECISION

	Intra-assay (10 tests on the same run)		
	CV%	IgG	IgM
CARDIO	low	8.2	9.9
	high	1.3	11.5
β ₂ GP1	low	11.4	7.8
	high	6.4	10.3
FII	low	7.7	12.4
	high	6.1	6.9

	Inter-assay (5 tests on different run)		
	CV%	IgG	IgM
CARDIO	low	14.6	13.7
	high	13.0	16.4
β ₂ GP1	low	18.0	10.5
	high	12.0	10.0
FII	low	3.8	9.5
	high	11.4	3.8

BIBLIOGRAPHY

ABUAF N. et al.

Vers une standardisation du dosage des anticorps anti-cardiolipine. *STV* 1993, 5 : 663-671

BAS DE LAAT H., et al.

Pathogenic anti-B2GP1 antibodies recognize domain I of B2GP1 only after a conformational change. *Blood* 2006 ; 107:1916-1924.

BEVER E.M.

Cofacteurs involved in the antiphospholipid syndrome. *Editorial. Lupus* 1992, 1 : 51-53

CHAMLEY L.W., et al

Conformationally altered B2GP1 is the antigen for anti-cardiolipin antibodies. *Clin Exp Immunol* 1999 ; 115:571-576

DE GROOT P.G., et al.

Anti-prothrombin antibodies and their relation with thrombosis and lupus anticoagulant. *Lupus* 7 : suppl2, S32, 1998

FONT J.

Anti-cardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations. *Clin. Rheum.* 1989, 8 : 475-785

GALLI M., et al.

Antiprothrombin antibodies : detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrom. *Blood* 1999 ; 93:2149.

HESS D.C.

Anti-cardiolipin antibodies: a study of frequency in TIA and stroke. *Neurology* 1991, 23 (suppl) : 129-132

ICHIKAWA K., et al.

A chimeric antibody with the human gamma1 region as a putative standard for assays to detect IgG B2GP1 dependent anti-cardiolipin and anti-B2GP1 antibodies. *Arthritis Rheum* 42 (1999) 2461-2470.

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).













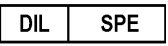

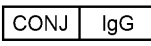
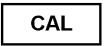
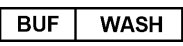




MIYAKIS S. et al.

International consensus statement on a update of the classification criteria for definite anti-phospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost* 2006, 4:295-306.

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE

	VOLUME TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
Dispense 50µL of microspheres reagent in each well to be used			
Incubation of the samples	100µL	Dilution buffer (B3) : Reagent blank	30 min. Room temperature
	100µL	Diluted negative control 1:101	
	100µL	Diluted positive control 1:101	
	100µL	Calibrator (in duplicate)	
	100µL	Diluted samples 1:101	
Washing 1	Wash twice in washing buffer (C3) (300µL/well)		
Incubation of the conjugate	100µL	Ready to use Anti-IgG or anti-IgM conjugate	30 min Room temperature
Washing 2	Wash 1 time in Dilution buffer (B3) (100µL/well)		
Reading	<p>Add 100µL/well of Dilution buffer (B3) and proceed immediately with the reading in FIDIS™ Instrument</p> <p><i>The reading must be doing in the hour following adding the solution (B3). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.</i></p>		

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
	Microplate		Negative control		Microspheres
	Specimen diluent		Positive control		IgG Conjugate
	Calibrator		Wash Buffer		Microsphere reconstitution buffer
	FIDIS test		Contains sodium azide		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

