

TEST DES ANTICORPS ANTI-CARDIOLIPIDES IgG et IgM RELISA®

Pour Utilisation Diagnostique In Vitro

Pour l'Usage Professionnel

Référence catalogue: 7096-02 (96 puits) et 7696-02 (576 puits)

UTILISATION PREVUE: Il s'agit d'un système de test par immunodosage enzymatique (EIA) pour la détection et la mesure des anticorps IgG et IgM anti-cardiolipides dans le sérum humain. Ce système doit être utilisé comme une aide à l'évaluation du risque de troubles thrombotiques chez les personnes atteintes de lupus érythémateux disséminé ou de syndromes similaires au lupus.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les anticorps anti-phospholipides, y compris les anticorps anti-cardiolipides, sont fréquemment détectés dans les sérums des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (1). De nombreux rapports ont associé ces auto-anticorps à divers troubles thrombotiques veineux et artériels, notamment infarctus cérébral (2), thrombose veineuse profonde (3), thrombopénie (1), embolie pulmonaire (4) et perte fœtale récurrente avec infarctus placentaire (5). « L'anticoagulant lupique » (6), substance qui prolonge le temps de céphaline activée *in vitro*, a également été associé à ces syndromes cliniques, bien qu'il ne soit pas identique à l'anticorps anti-cardiolipide. Les termes « anticoagulant lupique » et « anticorps anti-phospholipide » sont parfois employés indifféremment mais à tort car ces immunoglobulines ne sont pas identiques (1).

Le système de test d'Immuno Concepts est un immunodosage enzymatique à micropuits pour la détection des anticorps anti-cardiolipides dans le sérum humain. Il a été démontré que l'immunodosage en phase solide est une méthode extrêmement sensible et spécifique pour la détection des anticorps anti-cardiolipides (7-10). Le système de test d'Immuno Concepts a été normalisé à l'aide d'une préparation de référence au niveau international, obtenue auprès du Antiphospholipid Standardization Laboratory, les « normes Harris » (9). Les résultats objectifs obtenus par ce dosage sont communiqués en unités GPL pour les anticorps anti-cardiolipides IgG et en unités MPL pour les anticorps anti-cardiolipides IgM.

PRINCIPE DU TEST

Ce test est un immunodosage enzymatique indirect. Une préparation stabilisée de cardiolipide a été déposée à la surface des micropuits pour servir d'antigène. Le sérum étalon, les contrôles et les échantillons de patient dilués sont placés dans les micropuits et mis à incuber, ce qui permet aux anticorps anti-cardiolipides de l'échantillon de réagir à l'antigène sur la phase solide. Après le lavage visant à éliminer les anticorps non liés et les autres protéines sériques, les puits sont mis à incuber avec des anticorps anti-IgG ou IgM humaine marqués par de la peroxydase de raifort. Deux préparations d'anticorps conjugué à de la peroxydase de raifort sont incluses dans le système de test. L'une d'elles est spécifique à l'IgG humaine et l'autre à l'IgM humaine. Les concentrations des anticorps anti-cardiolipides IgG et IgM doivent être déterminées séparément à l'aide de ces deux conjugués.

Après incubation avec le conjugué de peroxydase de raifort, si les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable. Ce complexe se compose d'un anticorps anti-humain conjugué à de la peroxydase de raifort lié à un anticorps anti-cardiolipide humain, lui-même lié au cardiolipide stabilisé sur la surface en plastique.

Après un deuxième lavage, ce complexe est détecté par ajout d'une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) et de H₂O₂ servant de substrat chromogène. Le degré de développement de la couleur dans chaque puits est proportionnel à la concentration en anticorps anti-cardiolipides dans chaque échantillon de sérum.

Chaque micropuits est lu dans un spectrophotomètre et les résultats sont obtenus par comparaison des densités optiques des puits étalons et des puits d'échantillons.

COMPOSITION DES SYSTÈMES - MATÉRIELS FOURNIS

Conservation: Tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 10°C. Ne pas congeler.

Stabilité: Tous les composants sont stables pendant 12 mois à partir de la date de fabrication. Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Barrettes de micropuits recouverts de cardioline **PLATE**: Référence 7008-01. Une microplaque contenant 12 barrettes de 8 puits recouverts de solution stabilisée de diphosphatidyl-glycérol (cardiolipine) extrait de cœur de bœuf. Si le test requiert moins de huit puits, ils peuvent être séparés par simple rupture. Conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet absorbeur d'humidité, fermer hermétiquement, puis réfrigérer pendant 45 jours maximum.

Diluant pour échantillon **SOLN|DIL**: Référence catalogue 7100 (100 ml). Diluant tamponné propriétaire, utilisé pour diluer les échantillons de patient. Ce diluant contient le cofacteur apolipoprotéine H.

Contrôle positif de l'anticorps IgG anti-cardiolipide **CONTROL|+**: Référence catalogue 7021-02G. Flacon contenant 1.5 ml de sérum de contrôle humain positif anti-cardiolipide, prêt à l'emploi. Ce sérum contient les anticorps IgG anti-cardiolipides. Voir l'étiquette du flacon pour connaître les plages GPL attendues.

Contrôle positif de l'anticorps IgM anti-cardiolipide **CONTROL|+**: Référence catalogue 7021-02M. Flacon contenant 1.5 ml de sérum de contrôle humain positif anti-cardiolipide, prêt à l'emploi. Ce sérum contient les anticorps IgM anti-cardiolipides. Voir l'étiquette du flacon pour connaître les plages MPL attendues.



Contrôle négatif de l'anticorps anti-cardiolipide **CONTROL|-**: Référence catalogue 7031-01. Flacon contenant 2 ml de sérum de contrôle humain négatif anti-cardiolipide, prêt à l'emploi. Les valeurs GPL et MPL attendues sont inférieures à 5,0 unités.



Étalon de l'anticorps IgG anti-cardiolipide **CAL**: Référence catalogue 7026-02G. Flacon contenant 1,5 ml de sérum étalon positif anti-cardiolipide IgG humain, stable, liquide et prêt à l'emploi. Voir l'étiquette du flacon pour connaître la concentration en anticorps anti-cardiolipides exprimée en unités GPL.

Étalon de l'anticorps IgM anti-cardiolipide **CAL**: Référence catalogue 7026-02M. Flacon contenant 1,5 ml de sérum étalon positif anti-cardiolipide IgM humain, stable, liquide et prêt à l'emploi. Voir l'étiquette du flacon pour connaître la concentration en anticorps anti-cardiolipides exprimée en unités MPL.

Réactif immuno-enzymatique - Spécifique à l'IgG humaine **CONJ|HRP**: Référence catalogue 7009-02G (14 ml). Anti-IgG humaine conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP). Le réactif est prêt à l'emploi.

Réactif immuno-enzymatique - Spécifique à l'IgM humaine **CONJ|HRP**: Référence catalogue 7009-02M (14 ml). Anti-IgM humaine conjuguée à de la peroxydase de raifort (HRP). Le réactif est prêt à l'emploi.

Solution de substrat **SOLN|SUB**   : Référence catalogue 7035 (14 ml). Solution de substrat enzymatique spécifique à la HRP, contenant de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le réactif est prêt à l'emploi. **ATTENTION:** Inflammable. Ce réactif contient moins de 25% de méthanol et d'acétone. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

Réactif d'arrêt **SOLN|STOP**   : Référence catalogue 7033 (14 ml). Réactif d'arrêt propriétaire pour les systèmes de test EIA d'Immuno Concepts. Le réactif est prêt à l'emploi. **DANGER:** Corrosif. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3 % chacun par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS

Support pour micropuits

Tampon PBS [PWDR|PBS]: Référence catalogue 1011. Solution saline tamponnée au phosphate en poudre (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer un litre de solution. Chaque système complet contient deux sachets de poudre tampon pour chaque plateau de 96 micropuits.

Préparation: Dissoudre un sachet de poudre tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée, couvrir puis conserver entre 2 et 25°C pendant 4 semaines maximum ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou de modifications visibles apparaissent. NE PAS AJOUTER DE TWEEN 20 OU D'AUTRES DÉTERGENTS À CE TAMPON.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE REQUIS - MAIS NON FOURNI

Pipeteurs volumétriques de précision permettant de prélever 10 à 1 000 µl
Pissette en plastique pour distribuer la solution tampon de lavage dans les micropuits ou système de lavage des micropuits automatisé
Récipient d'un litre pour le tampon de lavage PBS
Eau désionisée ou distillée
Spectrophotomètre lecteur de microplaques capable de lire la densité optique (DO) à 450 nm
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier
Pipeteur multicanaux capable de remplir 8 puits à la fois
Gants jetables
Chronomètre de laboratoire

PRÉCAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la composition de ce produit ont été testés et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), de l'anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBSAg), selon les méthodes approuvées par la FDA. Néanmoins, aucune méthode de test ne peut assurer totalement l'absence de VIH-1, VIH-2, HCV, HBV ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériels doivent être manipulés de la même manière que des matériels considérés comme potentiellement infectieux.
2. Tous les sérums de contrôle, sérums étalons et échantillons de patient doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2, comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme conservateur dans les sérums de contrôle et étalons. Il est possible que l'azide de sodium réagisse au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et forme des azides métalliques extrêmement explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
4. La dilution des composants ou l'utilisation de composants autres que ceux fournis dans ce kit peut donner lieu à des résultats incohérents.
5. Ne pas procéder à une inactivation à la chaleur des échantillons de sérum utilisés pour le test de l'anti-cardiolipide, car cela peut entraîner des valeurs élevées.
6. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro*.
7. Ne pas pipeter avec la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de l'eau.
8. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
9. Éviter toute éclaboussure ou pulvérisation d'aérosols à tout moment.
10. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
11. La contamination croisée des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats. Pendant le test, les échantillons doivent rester confinés dans les micropuits.
12. Avant utilisation, la verrerie réutilisable doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
13. Avant utilisation, porter les réactifs, micropuits et échantillons à température ambiante (18-25°C).
14. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs puis se laver soigneusement les mains en fin de procédure technique.
15. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner de faux résultats.
16. Le réactif d'arrêt est corrosif et peut provoquer des brûlures. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3 % chacun par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Prélèvement: Le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 ml de sang entier doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adapté. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18-25°C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse. Immuno Concepts déconseille l'utilisation de plasma dans ce dosage en raison de la possibilité de contamination du plasma par les plaquettes. Celles-ci peuvent en effet affecter les résultats par réaction avec les anticorps anti-phospholipides.

ATTENTION: *Ne pas procéder à une inactivation à la chaleur des échantillons de sérum utilisés pour le test de l'anti-cardiolipide, car cela peut entraîner des valeurs élevées.*

Substances interférentes: Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent engendrer des résultats aberrants. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation: Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10°C pendant une semaine maximum. Si le test est reporté, ils doivent être congelés à -20°C minimum. Le sérum ne doit pas être conservé dans un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION: *Les congélations et décongélations successives des échantillons de patient peuvent induire des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.*

REMARQUES GENERALES RELATIVES A LA PROCEDURE

1. Il est extrêmement important que tous les composants du kit et les échantillons de sérum soient à température ambiante (18-25°C) avant utilisation. Il faut à un litre entier de tampon de lavage plusieurs heures pour atteindre 20°C à sa sortie du réfrigérateur. Les températures d'incubation au-dessus ou en dessous de la plage indiquée peuvent donner des résultats inexacts. Remettre les échantillons et les réactifs non utilisés au réfrigérateur après utilisation.
2. Avant utilisation, bien mélanger les réactifs en les retournant doucement de haut en bas. Ne pas créer de tourbillon dans les réactifs ou les secouer. Éviter la formation de mousse.
3. Lors de la préparation des dilutions d'échantillon, essuyer les embouts des pipettes avant de distribuer le sérum dans le diluant pour échantillon. Si un excès d'échantillon adhère à l'embout de la pipette, les résultats s'en trouveront affectés.
4. L'utilisation d'un pipeteur multicanaux est recommandée car il permet d'uniformiser la distribution du réactif ainsi que les durées d'incubation et de réaction.
5. **Un lavage adéquat des puits est extrêmement important.** Des puits mal lavés afficheront des valeurs de bruit de fond élevées ainsi que des valeurs faussement positives. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage. Pour un lavage homogène des puits, il est recommandé d'utiliser un système automatisé.
REMARQUE: En raison des divers types de techniques de lavage et de systèmes automatisés, le nombre de lavages peut être adapté pour obtenir des résultats optimaux. Chaque laboratoire doit déterminer le nombre de lavages le plus efficace pour son système de lavage.
6. Une élimination inadaptée des résidus de tampon de lavage peut conduire à un développement inadapté de la couleur. Taper vigoureusement les bandelettes de micropuits sur du papier ou des serviettes absorbants et les sécher afin d'éliminer au maximum les résidus de tampon de lavage.
7. Le respect du minutage de toutes les étapes est essentiel. Tous les échantillons de sérum doivent être dilués avant le début de la procédure et déposés dans les micropuits aussi rapidement que possible (moins de cinq minutes). La taille des lots doit être définie de manière à ce que la manipulation des échantillons puisse être accomplie sans précipitation dans ce laps de temps.
8. À l'exception de la dernière incubation (solution de substrat), chaque période d'incubation commence dès la fin de la distribution de l'échantillon ou du réactif. L'incubation de la solution de substrat doit durer exactement 15 minutes pour chaque puits. Tous les échantillons et réactifs doivent être distribués dans le même ordre et à un rythme constant.
9. Ne pas utiliser de Tween 20, Triton X-100 ou autres détergents dans les tampons de lavage ou les autres réactifs utilisés dans ce dosage.

RESULTATS

CALCULS

1. Soustraire la valeur de densité optique du puits à blanc IgG des valeurs de densité optique obtenues dans les puits d'échantillonnage, de contrôle et d'échantillon du patient IgG. Soustraire la valeur de densité optique du puits à blanc IgM des valeurs de densité optique obtenues dans les puits étalons, de contrôle et d'échantillon du patient IgM. Calculer les valeurs de densité optique moyennes pour les doubles de puits.
2. La concentration en anticorps anti-cardiolipide du sérum étalon (indiquée sur l'étiquette) est divisée par la valeur de densité optique moyenne des puits d'échantillonnage pour obtenir le facteur de conversion. Des facteurs de conversion séparés sont calculés pour l'IgG et l'IgM.
3. Les valeurs de densité optique de chacun des échantillons sont multipliées par le facteur de conversion afin d'obtenir la concentration en anticorps anti-cardiolipides en unités GPL ou MPL.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La valeur de densité optique moyenne des puits étalons doit être d'au moins 0,400.
2. Le puits de contrôle à blanc doit avoir une valeur de densité optique inférieure à 0,150. Les valeurs de densité optique à blanc supérieures à 0,150 indiquent un lavage inadéquat ou une contamination des réactifs.
3. Les valeurs d'anticorps anti-cardiolipides obtenues pour les sérums de contrôle positif et négatif doivent être comprises dans les plages indiquées sur les étiquettes. Ces plages ont été établies pour englober 95% des valeurs escomptées dues à une variation statistiquement normale. De faibles écarts peuvent occasionnellement être observés hors des plages. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères d'acceptation/de rejet en se fondant sur son expérience de ce dosage.
4. La signification clinique des niveaux d'anticorps anti-cardiolipides est toujours en cours d'étude. Les échantillons dont les valeurs d'anticorps anti-cardiolipines sont supérieures à la limite maximale de l'étalon doivent être rendus comme positifs avec un titre « supérieur à ou égal » au titre indiqué sur l'étiquette du sérum étalon.
5. Le facteur de conversion doit être calculé pour chaque analyse. L'utilisation d'un facteur de conversion d'une autre analyse ou l'inversion des facteurs de conversion GPL et MPL invalidera les résultats.
6. Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux. Pour exemple, se reporter à « Performances, Spécificité clinique ».

VALEURS ESCOMPTÉES

PLAGE DE RÉFÉRENCE

La signification clinique des anticorps anti-cardiolipines est toujours en cours d'étude. Cependant, la plupart des chercheurs s'accordent à penser qu'un taux faible d'anticorps anti-cardiolipine (17, 18) a peu de signification clinique. En s'appuyant sur les résultats de nos tests (cf. Caractéristiques et Performances) et sur le fait que les patients souffrant du Syndrome des Anti-phospholipide ont habituellement des taux d'anticorps d'anti-cardiolipine (17) de modéré à élevé, Immuno Concepts recommande les valeurs de référence suivantes :

Taux élevé = plus de 80 unités GPL ou MPL
Taux moyen = 20 à 80 unités GPL ou MPL
Taux Normal = inférieur à 20 unités GPL ou MPL

Il est suggéré à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence.

PRÉVALENCE DES ANTICORPS ATTENDUE

De nombreuses études ont montré l'association des anticorps anti-cardiolipides et du lupus érythémateux disséminé (1, 7, 8, 11-16). Dans ces études, la prévalence des anticorps anti-cardiolipides IgG allait de 23 à 54% (moyenne: 41,4%) et celle des anticorps anti-cardiolipides IgM de 5 à 41% (moyenne: 25,5%). Les différences de prévalence observées dans ces études sont probablement dues aux critères de sélection des patients, aux populations de patients étudiés ou aux niveaux d'anticorps considérés comme significatifs. Le système de test des anticorps anti-cardiolipides d'Immuno Concepts a été utilisé pour tester les échantillons de sérum de 58 patients, examinés dans le cadre d'une consultation rhumatologique. Ces patients ont été sélectionnés pour leurs maladies rhumatismales cliniques mais non pour un état pathologique spécifique ou des antécédents thrombotiques. Dans cette population, 56 échantillons (96,6%) étaient négatifs aux anticorps anti-cardiolipides IgG (27 échantillons inférieurs à 5 unités GPL et 29 dans la plage 5-20 GPL), 2 échantillons (3,4%) comportaient un niveau modéré d'anticorps anti-cardiolipides IgG et aucun ne présentait de niveau élevé. Un échantillon (1,7%) était positif aux anticorps anti-cardiolipides IgM au niveau modéré.

LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne peut pas être réalisé sur la base des titres d'anticorps anti-cardiolipides seuls. Le médecin doit interpréter ces résultats au regard des antécédents et des symptômes du patient, des observations physiques et des autres procédures de diagnostic.

2. Le traitement ne doit pas débiter sur la seule base d'un test positif aux anticorps anti-cardiolipides. Les indications cliniques, les autres analyses de laboratoire et le diagnostic clinique du médecin doivent être pris en compte avant de commencer tout traitement.
3. Si le patient est négatif aux anticorps anti-cardiolipides mais que les résultats cliniques suggèrent la présence d'anticorps anti-phospholipides, certains experts recommandent de tester la présence d'anticoagulant lupique afin de confirmer la négativité des résultats anti-cardiolipides. Si les résultats des anticorps anti-cardiolipides ou de l'anticoagulant lupique sont positifs, le patient est considéré comme positif aux anticorps anti-phospholipide (1).
4. Les patients souffrant d'infections syphilitiques positives d'un point de vue sérologique peuvent présenter un résultat positif aux anticorps anti-cardiolipides. Ces patients sont généralement considérés comme ne présentant pas un risque thrombotique aussi accru que celui observé chez les patients atteints de maladies rhumatismales accompagnées d'anticorps anti-cardiolipides. Dix-sept échantillons de patients souffrant de syphilis latente ou active confirmée (positifs au test d'immunofluorescence et/ou au test de microhémagglutination) ont été testés à l'aide du système de test des anticorps anti-cardiolipides IgG et IgM RELISA[®] d'Immuno Concepts. Douze (70,6%) de ces échantillons étaient positifs aux anticorps anti-cardiolipides IgG et trois (17,6%) étaient positifs aux anticorps anti-cardiolipides IgM, en plus de l'être aux anticorps IgG. Le diagnostic de la syphilis doit être confirmé ou écarté par les dosages d'anticorps anti-tréponèmes spécifiques.
5. Les anticorps anti-cardiolipides peuvent apparaître de manière transitoire dans de nombreuses infections. Si un patient s'avère positif et présente des signes cliniques d'infection, le test doit être recommencé une fois l'infection terminée.
6. Le facteur rhumatoïde peut influencer sur les dosages en phase solide pour les anticorps IgM, donnant des résultats faussement positifs.
7. Dans des études publiées portant sur des patients souffrant de lupus érythémateux disséminé, la prévalence des anticorps anti-cardiolipides IgG a été signalée comme étant comprise entre 23% et 54% et celle des anticorps anti-cardiolipides IgM comme étant comprise entre 5 et 41% des cas.
8. La signification clinique des anticorps anti-cardiolipides est toujours en cours d'étude. Les niveaux d'anticorps détectés avec ce système n'indiquent pas nécessairement la gravité ou la durée de la maladie.

PERFORMANCES

SPECIFICITÉ CLINIQUE

Contrôles sains: Les échantillons de sérum de 330 donneurs de sang sains ont été testés à l'aide du système de test des anticorps anti-cardiolipides d'Immuno Concepts. Parmi ces sujets, 327 (99,1%) étaient négatifs (246 échantillons inférieurs à 5 unités GPL et 81 dans la plage 5-20 GPL), 3 (0,9%) comportaient un niveau modéré d'anticorps anti-cardiolipides IgG et aucun ne présentait de niveau élevé. Lors du test de l'IgM, 329 (99,7%) étaient négatifs (318 échantillons inférieurs à 5 unités MPL et 11 dans la plage 5-20 MPL), 1 (0,3%) comportait un niveau modéré d'anticorps anti-cardiolipides IgM et aucun ne présentait de niveau élevé.

Contrôles des maladies rhumatismales: Les échantillons de sérum de vingt patients souffrant de maladies rhumatismales autres que le LED et sans antécédents d'épisodes thrombotiques, ont été testés à l'aide du système de test des anticorps anti-cardiolipides d'Immuno Concepts. Aucun n'était positif aux anticorps anti-cardiolipides IgG ou IgM.

SENSIBILITÉ CLINIQUE

Le système de test des anticorps anti-cardiolipides d'Immuno Concepts a été utilisé pour tester les échantillons de sérum de 58 patients, examinés dans le cadre d'une consultation rhumatologique. Ces patients ont été sélectionnés pour leurs maladies rhumatismales cliniques et non en fonction d'un état pathologique spécifique ou des antécédents thrombotiques. Dans cette population, 56 échantillons (96,6%) étaient négatifs aux anticorps anti-cardiolipides IgG (27 échantillons inférieurs à 5 unités GPL et 29 dans la plage 5-20 GPL), 2 échantillons (3,4%) comportaient un niveau modéré d'anticorps anti-cardiolipides IgG et aucun échantillon ne présentait de niveau élevé. Un échantillon (1,7%) était positif aux anticorps anti-cardiolipides IgM au niveau modéré.

Ces mêmes échantillons ont été testés par une méthode anti-cardiolipide ELISA de référence qui a révélé la présence d'anticorps anti-cardiolipides IgG dans ces deux mêmes échantillons et des anticorps anti-cardiolipides IgM dans ce même échantillon unique. Par conséquent, le système Immuno Concepts, comparé à la méthode de référence, a démontré une sensibilité et une spécificité à 100% concernant les anticorps anti-cardiolipides IgG et IgM. Les échantillons de sérum de 32 patients souffrant de LED et ayant déjà fait au moins un épisode thrombotique, ont été testés à l'aide du système de test des anticorps anti-cardiolipides d'Immuno Concepts. Sept de ces échantillons contenaient des anticorps anti-cardiolipides IgG au niveau modéré. En plus des anticorps anti-cardiolipides IgG, un échantillon comportait des anticorps anti-cardiolipides IgM au niveau modéré.

PRÉCISION

Huit échantillons dont les valeurs d'anticorps anti-cardiolipides IgG sont connues ont été dosés à neuf reprises. Le coefficient de variation (CV) inter-dosage pour ces échantillons était compris entre 6,4% et 10,4% (moyenne: 9,2%) et le CV inter-dosage pour les valeurs GPL était compris entre 1,9% et 10,0% (moyenne: 8,7%).

Huit échantillons dont les valeurs d'anticorps anti-cardiolipides IgM sont connues ont été dosés à neuf reprises. Le coefficient de variation (CV) inter-dosage pour les valeurs de densité optique de ces échantillons était compris entre 8,0% et 10,0% (moyenne: 8,7%) et le CV inter-dosage pour les valeurs MPL était compris entre 6,1% et 10,0% (moyenne: 7,7%).

Deux échantillons reconnus comme positifs aux IgG et deux autres reconnus comme positifs aux anticorps anti-cardiolipides IgM ont été dosés à dix reprises chacun. Les résultats du coefficient de variation (CV) inter-dosage de ces échantillons sont présentés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1

Échantillon	Niveau anti-cardiolipide	CV inter-dosage (DO)	CV inter-dosage (unités)
Positivité IgG faible	13 unités GPL	2,4%	5,1%
Positivité IgG modérée	70 unités GPL	9,6%	7,1%
Positivité IgM faible	9 unités MPL	5,0%	11,5%
Positivité IgM modérée	25 unités MPL	9,5%	7,0%

RÉCUPÉRATION

Deux échantillons dont les niveaux GPL sont connus (l'un faible et l'autre modéré), ont été dilués avec des proportions égales de solutions étalons contenant des quantités connues d'anticorps anti-cardiolipides IgG. Les données calculées, observées et de récupération sont présentées dans le Tableau 2.

TABLEAU 2

Échantillon	GPL calculé	GPL observé	Récupération (%)
Positivité faible	-	9,0	-
Positivité faible +10	10	11,0	110
Positivité faible +20	14,5	14,3	99
Positivité faible +40	24,5	25,3	103
Positivité faible +60	34,5	35,7	103
Positivité modérée	-	54,0	-
Positivité modérée +10	32,0	32,3	101
Positivité modérée +20	37,0	38,1	103
Positivité modérée +40	47,0	46,4	99
Positivité modérée +60	57,0	57,7	101

Deux échantillons dont les niveaux MPL sont connus (l'un faible et l'autre modéré), ont été dilués avec des proportions égales de solutions étalons contenant des quantités connues d'anticorps anti-cardiolipides IgM. Les données calculées, observées et de récupération sont présentées dans le Tableau 3.

TABLE 3

Échantillon	MPL calculé	MPL observé	Récupération (%)
Positivité faible	-	8,0	-
Positivité faible +5	7,5	7,3	97
Positivité faible +10	9,0	9,2	102
Positivité faible +20	14,0	14,3	102
Positivité faible +30	19,0	18,8	99
Positivité modérée	-	25,0	-
Positivité modérée +5	15,0	14,5	97
Positivité modérée +10	17,5	17,9	103
Positivité modérée +20	22,5	22,1	98
Positivité modérée +30	27,5	27,8	101

BIBLIOGRAPHIE

1. Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anti-phospholipid Antibodies. Clin. Rheum. Dis. 11:591-609, 1985.
2. Harris, E.N., Gharavi, A.E., Asherson, R.A., et al. Cerebral infarction in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. Clin. Exp. Rheumatol. 2:47-51, 1984.
3. Mueh, J.R., Herbst, K.D., Rapaport, S.I. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. Ann. Intern Med. 92:156-159, 1980.
4. Anderson, N.E., Ali, M.R. The lupus anticoagulant, pulmonary thromboembolism and fatal pulmonary hypertension. Ann. Rheum. Dis. 43:760-763, 1984.
5. Derue, G.J., Englert, H.J., Harris, E.N., et al. Fetal loss in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. J. Obstet. Gynaecol. 5:207-209, 1985.
6. Boey, M.L., Colaco, C.B., Gharavi, A.E., Elkon, K.B., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Brit. Med. J. 287:1021-1023, 1983.
7. Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin Antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythema-tosis. Lancet ii:1211-1214, 1983.
8. Loizou, S., McCrea, J.D., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., and Harris, E.N. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin. Exp. Immunol 62:738-745, 1985.
9. Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. Arth. Rheum. 30:835-837, 1987.
10. Harris, E.N. Solid-phase anticardio-lipin test revisited. Am. J. Med. 85:599-601, 1988.
11. Colaco, C.B., Male, D.K. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. Clin. Exp. Immunol. 59:449-456, 1985.
12. McHugh, N.J., Maymo, J., Skinner, R.P., James, I., and Maddison, P.J. Anticardiolipin antibodies, livedo reticularis, and major cerebrovascular and renal disease in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 47:110-115, 1988.
13. Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H., Tomioka, H., and Yoshida, S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 56:193-199, 1984.
14. Cronin, M.E., Biswas, R.M., Van der Straeton, C., Fleisher, T.A., and Klippel, J.H. IgG and IgM Anticardiolipin Antibodies in Patients with Lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J. Rheumatol. 15:795-798, 1988.
15. Sturfelt, G., Nived, O., Norberg, R., Thorstensson, R., and Krook, K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arth. Rheum. 30:382-388, 1987.
16. Ishii, Y., Nagasawa, K., Mayumi, T., and Niho, Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 49:387-390, 1990.
17. Harris, E.N. and Spinnato, J.A. Should anticardiolipin tests be performed in otherwise healthy pregnant women? Am. J. Obstet. Gynecol. 165:1272-1277, 1991.
18. Harris, E.N. A Reassessment of the Antiphospholipid Syndrome. J. Rheumatol. 17:733-735, 1990.

Si l'emballage de protection est endommagé, veuillez contacter Immuno Concepts avant toute utilisation.



Constructeur



Représentant autorisé dans le Communauté européen



Limitation de la Température



Contient suffisamment pour <n> essais



Consultez les instructions pour l'usage



Dispositif Médical Diagnostique In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 7096-02-I,

4.11.02.003.099-Fr

Rev 5.1

© Copyright 2015

PROCÉDURE DE TEST DES CARDIOLIPIN IGG ET IGM RELISA®

Tous les échantillons, réactifs (y compris solution tampon de lavage) et micropuits doivent être à température ambiante avant utilisation.

- 1. PRÉPARATION DU FORMULAIRE**
Étiqueter le formulaire inclus dans le kit afin d'indiquer l'emplacement des échantillons dans les micropuits. Un puits est utilisé comme blanc de réactif pour les dosages IgG et un second comme blanc de réactif pour les dosages IgM. Nous recommandons que chaque échantillon de patient, étalon et de contrôle pour les anticorps anti-cardiolipides IgG et IgM soit dosé en double jusqu'à ce que vous ayez établi une précision acceptable pour le dosage dans votre laboratoire.
- 2. RECONSTITUTION DU TAMPON DE LAVAGE (PBS)**
Dissoudre le contenu d'un sachet de tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Le PBS peut être couvert et conservé à 2-25°C pendant quatre semaines.
- 3. DILUTION DES ÉCHANTILLONS DES PATIENTS**
Diluer les échantillons des patients à 1:100 en ajoutant 10 µl de sérum à 990 µl de diluant pour échantillon. Bien mélanger. Les contrôles et l'étalon sont pré-dilués et ne doivent pas être dilués de nouveau.
- 4. PRÉPARATION DES MICROPUITS**
Sortir du sachet le nombre de barrettes nécessaires à la manipulation et les positionner sur le support. Les micropuits doivent être clipsés fermement sur le support. Pour ce faire, appuyer sur les deux extrémités des barrettes jusqu'à l'enclenchement sur le support. Si le test requiert moins de huit puits, ils peuvent être séparés par simple rupture. Si vous utilisez des puits isolés ou une barrette incomplète, veiller à ce que chaque puits soit correctement placé afin qu'il ne tombe pas lors du retournement du support. Conserver les barrettes non utilisées à l'intérieur de la pochette plastique en présence du sachet absorbant d'humidité, fermer hermétiquement, puis réfrigérer pendant 45 jours maximum.
- 5. DISTRIBUTION DES DILUTIONS SÉRIQUES**
Déposer 100 µl d'étalon, de contrôle et d'échantillon de patient dans les puits appropriés comme décrit sur le formulaire. Déposer 100 µl de diluant pour échantillon dans le puits du blanc de réactif.
- 6. INCUBATION DES MICROPUITS (30 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Mettre à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les puits doivent être protégés des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation. Recouvrir, le cas échéant, les puits d'un film transparent ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.
- 7. LAVAGE DES MICROPUITS (voir Remarques générales relatives à la procédure 5 et 6)**
Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage PBS. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.
- 8. DISTRIBUTION DU RÉACTIF IMMUNO-ENZYMATIQUE**
Déposer 100 µl de réactif immuno-enzymatique anti-IgG dans chacun des puits pour le blanc IgG, l'étalon GPL, les contrôles IgG et les échantillons de patient IgG. Déposer 100 µl de réactif immuno-enzymatique anti-IgM dans chacun des puits pour le blanc IgM, l'étalon MPL, les contrôles IgM et les échantillons de patient IgM.
- 9. INCUBATION DES MICROPUITS (30 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Mettre à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les puits doivent être protégés des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation. Recouvrir, le cas échéant, les puits d'un film transparent ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.
- 10. LAVAGE DES MICROPUITS**
Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage PBS. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis remplir ceux-ci de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage suivant l'aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les renversant puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.
- 11. DISTRIBUTION DE LA SOLUTION DE SUBSTRAT**
Utiliser un chronomètre pour respecter le minutage et déposer 100 µl de solution de substrat dans chacun des puits. La solution de substrat doit être ajoutée aux puits à un rythme constant, de manière à ce que l'incubation de chaque puits ait la même durée (15 minutes). La solution de substrat mise à incuber avec des échantillons positifs se colore en bleu et celle mise à incuber avec des échantillons négatifs variera d'incolore à bleu très pâle.
- 12. INCUBATION DES MICROPUITS (exactement 15 minutes à température ambiante, soit 18-25°C)**
Mettre à incuber à température ambiante pendant exactement 15 minutes. Les puits doivent être protégés des courants d'air ou des variations de température pendant l'incubation.
- 13. DISTRIBUTION DU RÉACTIF D'ARRÊT**
Après incubation du premier puits pendant exactement 15 minutes, ajouter 100 µl de réactif d'arrêt dans chaque puits, dans le même ordre et au même rythme que pour l'ajout de solution de substrat. Dès l'ajout de réactif d'arrêt, la solution de substrat bleue devient jaune et la solution incolore demeure incolore.
- 14. LECTURE DE LA DENSITÉ OPTIQUE DES PUIITS**
Dans les 30 minutes suivant l'ajout de réactif d'arrêt, les puits doivent être lus à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques. Les puits sont lus à 450 nm par rapport au puits du blanc de réactif. Si un spectrophotomètre à double longueur d'onde est disponible, la longueur d'onde pour le filtre de référence doit être réglée sur 600-650 nm. La lecture des micropuits à 450 nm sans filtre de référence donne des valeurs de densité optique plus élevées.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649
ou messagerie électronique: technicalsupport@immunoconcepts.com

