



Screen Anti-Phospholipides

pour analyses de routine

Détermination quantitative des auto-anticorps anti-phospholipides dans le sérum ou le plasma

IVD



LOT

Voir étiquette externe

2°C  8°C  Σ = 96 déterminations

REF 39826

UTILISATION PREVUE

Le coffret « screen Anti-phospholipides » est un test immunoenzymatique en phase solide pour la recherche quantitative des auto-anticorps anti-cardiolipines de classe IgG et IgM dans le sérum ou le plasma humain. Les anticorps anti-cardiolipines reconnaissent principalement le complexe phospholipides anioniques/ β2-glycoprotéine I. Les principaux phospholipides anioniques impliqués sont les cardiolipines, la phosphatidyl sérine, le phosphatidyl inositol et l'acide phosphatidique. Ce test de diagnostic in vitro est un support dans le diagnostic et l'évaluation du risque de thrombose chez les patients ayant un Lupus Erythémateux Systémique (LES) ou des désordres similaires.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

La première étude sur les anticorps anti-phospholipides commença en 1906 quand Wasserman introduisit un test sérologique pour la syphilis. En 1942 on découvrit que la composante active était un phospholipide du nom de Cardiolipine. Dans les années 50, il apparut qu'un nombre élevé de personnes pouvait être positif pour le test de la syphilis mais ne présenter aucun signe clinique de la maladie. Au début on classa le phénomène comme une série de faux positifs du test de la syphilis, par la suite il apparut que dans ce groupe de patients il y avait une prévalence élevée de désordres auto-immunitaires parmi lesquels le Lupus Erythémateux Systémique (LES) et le Syndrome de Sjögrens.

Le terme Lupus anticoagulant (LA), utilisé pour la première fois en 1972, dérive d'observations expérimentales dans lesquelles on observa une augmentation du risque de thrombose liée paradoxalement à la présence de certains facteurs anti-coagulants; le terme LA n'est pas tout à fait correct car la pathologie se présente plus fréquemment chez les patients sans lupus et est associé à des thromboses plutôt qu'à un saignement anormal.

Plus récemment, le rôle d'un cofacteur, la protéine β2-glycoprotéine I (apolipoprotéine H) appelé aussi β2GPI, et ses interactions avec les phospholipides anioniques contenus dans le sérum/plasma humain a été étudié. Ce cofacteur est une β-globuline avec poids moléculaire de 50 kDa qui se trouve dans le plasma à la concentration d'environ 200 µg/mL. On a découvert que la β2GPI est impliquée dans la régulation de la coagulation du sang, inhibant la voie intrinsèque. La β2GPI in vivo est associée à des substances chargées négativement, tels que par exemple les phospholipides anioniques, l'héparine et les lipoprotéines. La région qui lie les phospholipides est située dans son cinquième domaine.

Avec l'acronyme "aPL" (anticorps anti-phospholipides) on entend de façon impropre les anticorps dirigés contre les phospholipides chargés négativement tels que la Cardiolipine (CL), la Phosphatidyl sérine (PS), le Phosphatidyl inositol (PI) et l'Acide Phosphatique (PA); selon une acception plus correcte du terme, sont entendus comme anticorps anti-phospholipides ces anticorps dirigés contre le complexe entre la β2GPI et les phospholipides anioniques capables de se lier au cinquième domaine de la β2GPI. Parmi ceux-ci, la Cardiolipine est le phospholipide utilisé le plus communément comme antigène pour doser les aPL par méthode ELISA. Les laboratoires de diagnostic mesurent les anticorps dirigés contre le complexe entre la β2GPI et les phospholipides chargés négativement, tels que la Phosphatidyl sérine (PS), le Phosphatidyl inositol (PI) et l'Acide phosphatique (PA).

Certains chercheurs ont suggéré que l'utilisation de la PS à la place de la Cardiolipine dans les dosages ELISA permettrait un diagnostic plus précis. Cependant, les anticorps anti-phospholipides sont utilisés moins communément et leur utilisation supplémentaire peut augmenter la sensibilité clinique dans les échantillons de patients avec un « Syndrome des Anti-phospholipides » (APS) supposé, mais ne peut remplacer la détermination des auto-anticorps anti-Cardiolipine.

2. PRINCIPE DE LA METHODE

Le test des anti-phospholipides se base sur la liaison des anticorps présents dans le sérum et dirigés contre les complexes antigéniques formés par des phospholipides anioniques, parmi lesquels la Cardiolipine, la Phosphatidyl sérine, le Phosphatidyl inositol, l'Acide Phosphatique et la β2-Glycoprotéine; ces complexes sont adsorbés sur la microplaque. Tous les anticorps présents dans les étalons, dans les contrôles, et dans les échantillons de sérum ou plasma pré-dilués des patients, pourront se lier aux antigènes adsorbés sur la microplaque. Après 60 minutes d'incubation, la microplaque est lavée avec une solution de lavage pour enlever les composants du sérum qui n'ont pas réagi. Une solution d'immunoglobuline anti-IgG humaine (ou IgM) conjuguée avec la peroxydase (Conjugué) reconnaît les anticorps de classe IgG (ou IgM) liés aux antigènes immobilisés. Après 30 minutes d'incubation, l'excès de conjugué enzymatique qui ne s'est pas lié spécifiquement, est enlevé par lavage avec un tampon (Solution de lavage). On ajoute ensuite une solution substrat chromogénique (Substrat TMB) contenant de la Tétraméthylbenzidine. Après 15 minutes d'incubation, le développement de la couleur est bloqué par ajout de la solution d'arrêt. La couleur de la solution devient jaune, et

l'intensité de couleur développée est directement proportionnelle à la concentration en anticorps IgG (ou IgM) se trouvant dans l'échantillon original.

3. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENT

3.1. Réactifs et matériels fournis dans le kit

1. Standards IgG et IgM Anti-Phospholipides

5x (1 flacon = 1,0 mL, prêt à l'emploi)

Tampon phosphate 0,1 M NaN₃ < 0,1%

STD0 REF DCE002/11406-0

STD1 REF DCE002/11407-0

STD2 REF DCE002/11408-0

STD3 REF DCE002/11409-0

STD4 REF DCE002/11410-0

2. Contrôles (1 flacon = 1,0 mL, prêt à l'emploi)

Tampon phosphate 0,1 M NaN₃ < 0,1%

Contrôle Positif REF DCE045/11402-0

3. Diluant Echantillon (1 flacon = 100 mL, prêt à l'emploi)

Tampon phosphate 0,1 M NaN₃ < 0,1%

REF DCE053/11453-0

4. Conjugué IgG (1 flacon = 15 mL, prêt à l'emploi)

Conjugué Anti h-IgG avec peroxydase, BSA 0,1%,
Proclin < 0,003%

REF DCE002/11402-G

5. Conjugué IgM (1 flacon = 15 mL, prêt à l'emploi)

Conjugué Anti h-IgM avec peroxydase, BSA 0,1%,
Proclin < 0,003%

REF DCE002/11402-M

6. Microplaque recouverte

(1 microplaque fractionnable)

REF DCE002/11403-0

7. Substrat TMB (1 flacon = 15 mL, prêt à l'emploi)

3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine 0,26 g/L, peroxyde
d'hydrogène 0,05%

REF DCE004

8. Solution de lavage conc. 10X (1 flacon = 50 mL)

Tampon phosphate 0,2 M, proclin < 0,002%

REF DCE054

9. Solution d'arrêt (1 flacon = 15 mL, prêt à l'emploi)

Acide sulfurique 0,15 M

REF DCE005

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le kit

Eau distillée.

3.3. Matériel et équipement auxiliaire

Distributeurs automatiques.

Lecteur pour microplaques (450 nm).

4. PRECAUTIONS

- Ce kit est le diagnostic in vitro, à effectuer par du personnel expérimenté.
- Suivre rigoureusement la séquence des passages indiquée dans ce protocole.
- Observer les recommandations pour l'exécution du contrôle de qualité dans les laboratoires cliniques en testant les contrôles et/ou les pools de sérums.
- Tous les réactifs doivent être conservés à température contrôlée de 2-8°C dans le récipient d'origine.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents. Les dates de péremption reportées sur les étiquettes des récipients d'expédition et de tous les flacons doivent être respectées. Ne pas utiliser de composants après la date de péremption.
- Avant utilisation, laisser tous les composants des kits et les échantillons à température ambiante et mélanger soigneusement.
- Tous les réactifs d'origine humaine utilisés pour la préparation des standards et des contrôles ont été analysés et sont non réactifs aux HIV 1 et 2 et aux anticorps HCV et Hbs Ag. Cependant, aucun test

n'offre la certitude complète de l'absence de HIV, HBV, HCV ou d'autres agents infectieux. C'est pourquoi les contrôles positif et négatif et les standards doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectés.

- Eviter le contact entre la solution tampon de peroxyde et les matériels facilement oxydables ; les températures extrêmement élevées pourraient provoquer une combustion spontanée.

5. CONDITIONS DE CONSERVATION

- Conserver tous les réactifs du kit à 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption s'ils sont conservés et traités en suivant les instructions fournies.
- Les barrettes des puits non utilisées doivent être replacées immédiatement dans l'enveloppe refermable contenant le matériel de dessiccation et conservées dans l'enveloppe bien fermée à 2-8°C.

6. PROCEDURE

6.1. Préparation des Standards (S₀, S₄)

Les standards sont prêts à l'usage et sont mixtes: ils contiennent donc les anticorps IgG et les IgM et les concentrations présentes sur l'étiquette reportent les valeurs calibrées par rapport au matériel de référence de Harris.

6.2. Préparation de l'échantillon

Pour la réalisation du test, on peut utiliser des échantillons de sérum ou de plasma. Les échantillons à utiliser doivent être limpides. Il est conseillé d'éviter les contaminations dues à l'hyperlipémie, même si ces dernières n'interfèrent pas avec l'analyse. Les échantillons peuvent être conservés réfrigérés à 2-8°C pendant max 5 jours, ou bien congelés à -20°C pour 6 mois. Il est conseillé d'éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons de sérum qui pourraient conduire à une perte variable de l'activité des auto-anticorps. L'analyse d'échantillons inactivés par la chaleur est déconseillée.

Tous les échantillons de sérum doivent être dilués au 1:100 avec le diluant échantillon. Donc 10 µL de sérum peuvent être dilués avec 1000 µL de diluant échantillon.

6.3. Préparation de la Solution de lavage

Avant utilisation, diluer le contenu du flacon de la "Solution de lavage conc. 10X" avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 500 mL. Pour préparer des volumes inférieurs, respecter le rapport de dilution de 1:10. La solution de lavage diluée est stable à 2-8°C pendant au moins 30 jours. Dans la solution de lavage concentrée, on peut observer la présence de cristaux, dans ce cas, agiter à température ambiante jusqu'à complète dissolution des cristaux, pour une plus grande précision, diluer tout le flacon de la solution de lavage concentrée à 500mL en ayant soin de transférer aussi les cristaux avec le lavage du flacon, agiter ensuite jusqu'à dissolution complète.

6.4. Procédure

Porter tous les réactifs à température ambiante (22-28°C) pendant au moins 30 minutes.

Puisqu'il faut travailler en double, préparer deux puits pour chaque point de la courbe Standard (S₀-S₄), deux pour chaque échantillon et un pour le blanc.

Distribuer:

Réactifs	Standard	Echantillon	Blanc
Standard S ₀ -S ₄	100 µL		
Contrôle	100 µL		
Echantillon dilué		100 µL	
Incuber 60 minutes à température ambiante (22-28°C). Enlever le contenu de chaque puit, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Conjugué	100 µL	100 µL	
Incuber 30 minutes à température ambiante (22-28°C). Enlever le contenu de chaque puit, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Substrat TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incuber 15 minutes dans l'obscurité à température ambiante (22-28°C).			
Solution d'arrêt	100 µL	100 µL	100 µL
Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc.			

Pour éviter la contamination microbienne, il est conseillé de prélever du flacon du conjugué-HRP uniquement la quantité de conjugué nécessaire pour la réalisation du test. Ne jamais remettre le conjugué utilisé dans le flacon original.

7. CONTROLE DE QUALITE

- Le contrôle positif pour les anti-phospholipides doit être inclus chaque fois que l'on effectue un test pour s'assurer que tous les réactifs et que le test fonctionnent correctement.
- Puisque le contrôle est prédilué, il ne représente pas un contrôle de procédure pour les techniques de dilution utilisées pour les échantillons.
- D'autres sérums de contrôle peuvent être préparés en recueillant un pool de sérums humains, en les fractionnant et en les conservant à < -20°C.
- Pour que les résultats des tests soient considérés valides, tous les critères suivants doivent être satisfaits. Si même un seul ne rentre pas dans les valeurs spécifiées, les résultats ne pourront être considérés valables et le test devra être répété:
 - Le contrôle positif sert à contrôler un éventuel mauvais fonctionnement des réactifs mais il n'est pas lié à la précision de la valeur seuil du test.
 - Le test est valable uniquement si la densité optique à 450 nm du contrôle positif ainsi que celle des étalons (S₀-S₄) coïncident avec les intervalles correspondants indiqués dans le Certificat de Contrôle de Qualité inclus dans le kit.

8. CALCUL DES RESULTATS

Pour le screen anti-phospholipides, il est recommandé d'utiliser les courbes log (x) / lin (y) et 4 paramètres d'ajustement. L'approximation de Spline et les coordonnées log-log peuvent également être utilisées. Il est cependant recommandé d'utiliser une courbe Lin-Log.

Tout d'abord, il faut calculer la moyenne des densités optiques pour chaque étalon. Utiliser une feuille de papier log/linéaire et reporter les valeurs des densités optiques de chaque étalon sur l'axe des ordonnées (axe des Y) et les valeurs des concentrations correspondantes sur l'axe des abscisses (axe des X). Dessiner la courbe qui s'approche le mieux de tous les points d'étalonnage. Les points des étalons peuvent aussi être reliés avec des segments de ligne droite. La concentration des échantillons inconnus peut être déterminée en reportant la valeur de la DO obtenue sur la courbe de calibration.

9. VALEURS DE REFERENCE

Dans une étude sur les valeurs normales effectuée avec des échantillons de sérum provenant de donneurs sains, on a déterminé les intervalles de normalité suivants avec le test Screen Anti-Phospholipide:

	Anti-Phospholipide Ab	
	IgG (GPL U/mL)	IgM (MPL U/mL)
Normal	< 10	< 10
Elevé	≥ 10	≥ 10

Les valeurs reportées ci-dessus sont des valeurs suggérées. Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de plage de référence, en fonction de la procédure utilisée, des contrôles, de l'appareillage et de la population de patients selon ses propres méthodes standard.

Les résultats positifs devraient être vérifiés en rapport avec l'état clinique du patient. De plus, toute décision relative à la thérapie devrait être prise individuellement.

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages de références normales et pathologiques de Ab-Anti-Phospholipide sériques.

10. LIMITATIONS DU TEST

La présence dans l'échantillon de complexes immunitaires ou d'autres agrégats d'immunoglobulines peut conduire à des réactions aspécifiques avec par conséquent à des résultats faux positifs.

11. PARAMETRES CARACTERISTIQUES

11.1. Précision et reproductibilité

La précision et la reproductibilité ont été évaluées en testant huit répliques de deux échantillons positifs dans deux expériences différentes avec deux lots de kits différents.

Les opérations de distribution ont été effectuées manuellement par un opérateur.

Les résultats en terme de déviation standard et coefficient de variation sont reportés ci-après:

Echantillon	IgG			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-test	8.1	5.8	1.02	4.1
Inter-tests	9.8	6.1	3.34	7.6
Echantillon	IgM			
	1		2	
	SD	CV%	SD	CV%
Intra-test	7.32	5.6	3.33	7.2
Inter-tests	11.53	7.6	3.45	6.1

11.2. Sensibilité

Des tests de corrélation avec un kit analogue commercial de référence, effectués sur 18 sérums (dont 4 positifs pour IgG, 8 positifs pour IgM et 14 négatifs pour IgG, 10 négatifs

pour IgM) ont montré une sensibilité de 100,0% pour les IgG et de 87,5% pour les IgM.

11.3. Spécificité

Des tests de corrélation avec un kit analogue commercial de référence, effectués sur 18 sérums (dont 4 positifs pour IgG, 8 positifs pour IgM et 14 négatifs pour IgG, 10 négatifs pour IgM) ont montré une spécificité de 92,9% pour les IgG et de 90,0% pour les IgM.

11.4. Limites de détection:

La plus faible concentration qui peut être distinguée par le standard zéro est d'environ 1 U/mL.

12. DISPOSITIONS POUR L'ELIMINATION

Les réactifs doivent être éliminés en accord avec les lois locales.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E.: The Anticardiolipin Syndrome. J. Rheumat. 13, 3: 486-489, 1986.
2. Harris E.N. et al.: Evaluation of the anti-Cardiolipin antibody test: report of an international Workshop held 4 April 1986. Clin. Exp. Immunol. 68: 215-222, 1987.
3. Domke N., Siegert G.: Phospholipidantikörper und ihre klinische Bedeutung. Zeitschrift für Klinische Medizin 16: 1399-1401, 1988.
4. Pengo V. et al.: Immunological Specificity and Mechanism of Action of IgG Lupus Anticoagulants. Blood, Vol. 70. N. 1: 69-76, 1987.

SUGGESTIONS POUR LA RESOLUTION DES PROBLEMES /TROUBLESHOOTING

ERREURS CAUSES POSSIBLES/SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'échantillon

- absence distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution de l'échantillon (ex. Distribution accidentelle des réactifs en séquence erronée ou provenant de flacons erronés, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basses)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop bref, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop hautes)

- conjugué non adéquat (ex. ne provenant pas du kit original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (faible degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non complètement enlevé)

Valeurs inexplicables hors échelle

- contamination de pipette, embouts ou récipients- lavages insuffisants (conjugué pas complètement enlevé)
- CV% intra-test élevé
- réactifs et/ou strip non portés à température ambiante avant l'utilisation
- le laveur pour microplaques ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)
- CV% inter-test élevé
- conditions d'incubation non constantes (durée ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler la séquence de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs

Ed 10/2009

DE*Verwendete Symbole***EL***Επεξήγηση συμβόλων***EN***Explanation of symbols***ES***Explicación de los símbolos***FR***Explication des symboles***IT***Spiegazione dei simboli***PT***Significado dos símbolos*

	DE In-vitro-Diagnostikum EL In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή EN In vitro diagnostic medical device ES Para diagnóstico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro IT Dispositivo di diagnostica in vitro PT Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro		DE Hergestellt von EL Κατασκευαστής EN Manufacturer ES Fabricado por FR Fabriqué par IT Fabbrikante PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer EL Αριθμός καταλόγου EN Catalogue number ES Número de catálogo FR Références du catalogue IT Numero di catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungsdatum EL Ημερομηνία κατασκευής EN Date of manufacture ES Fecha de producción FR Date de fabrication IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis (letzter Tag des Monats) EL Χρήση έως (η τελευταία ημέρα του μήνα) EN Use by (last day of the month) ES Fecha de caducidad (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar até (antes do último dia do mês)		DE Biogefährdung EL Βιολογικός κίνδυνος EN Biological risk ES Riesgo biológico FR Risque biologique IT Rischio biologico PT Risco biológico
 	DE Gebrauchsanweisung beachten EL Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης EN Read instructions for use ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung EL Αριθμός παρτίδας EN Batch code ES Código de lote FR Numéro de lot IT Codice del lotto PT Lote
 Σ = xx	DE Ausreichend für "n" Tests EL Το περιεχόμενο επαρκεί για "n" δοκιμασίες EN Contents for "n" tests ES Contenido suficiente para "n" ensayos FR Contenu suffisant pour "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Conteúdo suficiente para "n" testes		DE Inhalt EL Περιεχόμενο του κιτ EN Contents of kit ES Contenido del kit FR Contenu du coffret IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich EL Όρια θερμοκρασίας EN Temperature interval ES Temperatura de conservación FR Limites de température de conservation IT Limiti di temperatura PT Intervalo de temperatura		



Manufacturer:
DiaMetra S.r.l. Headquarter:
Via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI)
Tel. 0039-02-2139184 - 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufacturing site:
Via Giustozzi 35/35a
Z.I Paciana
06034 FOLIGNO (PG) ITALY.
Tel. 0039-0762-24864
Fax 0039-0762-316197
E-mail: info@diametra.com

UK
UNITED KINGDOM
Distributed by
A. Menarini Diagnostics Ltd
405 Wharfedale Road
Winnersh - Wokingham
Berkshire RG41 5RA

DE
DEUTSCHLAND
Vertrieb durch
A. Menarini Diagnostics
Eine Division der
Berlin-Chemie AG
Glienicke Weg 125
12489 Berlin

EL
Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argroupolis
Attiki

ES
ESPAÑA
Distribuido por
A. Menarini Diagnostics S.A.
Avenida del Maresme, 120
08918 Badalona
Barcelona

FR
FRANCE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura
BP 70511
94633 Rungis Cedex

IT
ITALIA
Distribuito da
A. Menarini Diagnostics
Via Lungo l'Enza, 7
50012 Bagno a Ripoli
Firenze

PT
PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos