



Dr. Fenning
BioMed GmbH

fr-elisa

Autoimmune-Diagnostic

Cardiolipin-IgM

11013

Test Immunologique Enzymatique pour la Détection Cardiolipine-IgM

N° Produit 11013

Remarques importantes:

- Avant utilisation, lire attentivement les instructions pour le fr-elisa.
- Le kit doit être conservé entre 2-8°C. Ne pas congeler.
- Veuillez contrôler la date de péremption de chaque réactif et ne pas les utiliser si elle est dépassée.
- Porter le contenu du kit à température ambiante!
- Toujours ouvrir l'emballage de la plaque de micro-titration après avoir atteint la température ambiante.
- Le tampon de lavage et le tampon d'échantillon sont présentés sous une forme plus concentrée par rapport aux dilutions de travail requises dans le test. Après dilution des solutions concentrées, veuillez tenir compte des dates de péremption suivantes: le tampon d'échantillon ainsi que le tampon de lavage dilués doivent être conservés entre 2° et 8°C pendant 2 semaines maximum.
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kits de test fr-elisa.

Généralités:

Les anticorps contre les phospholipides (APAs) ont été associés à l'apparition de thrombose, thrombocytopénie, avortement fœtal, insuffisance cérébro-vasculaire et infarctus du myocarde (syndrome anti-phospholipides). Les anticorps anti-cardiolipine peuvent être de type IgG, IgM ou IgA: la signification clinique de ces trois sous-classes principales d'immunoglobulines est un sujet de discussion controversée. La présence d'anti-cardiolipine IgG semble être le test le plus prédictif et le plus spécifique pour la thrombose, la thrombocytopénie et la perte fœtale récurrente. De plus, les titres d'anticorps anti-cardiolipine IgG sont étroitement associés avec des complications neurologiques dans le lupus érythémateux systémique et chez les patients avec d'autres maladies auto-immunitaires. Cependant, les patients avec des données cliniques associées aux anti-cardiolipines ont souvent des taux d'anticorps anti-cardiolipine IgM et IgA élevés. Il est donc devenu important cliniquement de déterminer la présence de chacune de ces classes d'auto-anticorps dans le sérum des patients.

- CRONIN ME, BISWAS RM, VAN DER STRAETON C, FLEISCHER TA et al.: IgG and IgM anticardiolipin antibodies in lupus anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J. Rheumatol., 15: 795-798 (1988).
- COWCHOCK S, FORT J, MUNOZ S, NORBERG R et al. False positive ELISA test for anticardiolipin antibodies in sera from patients with repeated abortions, rheumatologic disorders, and primary biliary cirrhosis: Correlation with elevated polyclonal IgM and implications for patients with repeated abortions. Clin. Exp. Immunol., 73: 289-294 (1988).
- HARRIS EN. Solid-phase anticardiolipin test revisited [editorial], Am. J. Med., 85: 599-601 (1988).
- WILSON WA; GHARAVI AE, KOIKE T, LOCKSHIN MD et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Arthritis & Rheumatism Vol.42 No.7: 1309-1311 (1999)
- LOCKSHIN MD, SAMMARITANO LR, SCHWARTZMAN S. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. Arthritis & Rheumatism Vol.43 No.2: 440-443 (2000)
- MIYAKIS S, LOCKSHIN MD, ATSUMI T, BRANCH DW, BREY RL, CERVERA R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb and Haemost 4: 295-306 (2006)

Principe de la Méthode:

Les kits sont des tests immunologiques enzymatiques en phase solide. Les puits de micro-titration sont recouverts de cardiolipine et de β 2-glycoprotéine I (β 2-GPI, apolipoprotéine H), ce dernier étant un co-facteur de la cardiolipine, qui forme des complexes avec la cardiolipine. La présence de complexes cardiolipine et β 2-glycoprotéine I permet à certains anticorps cardiolipine spécifiques de se lier à la phase solide. Les puits de la micro-plaque recouverts d'antigènes sont incubés avec les étalons, les contrôles et les échantillons de sérum des patients. Durant l'incubation, les anticorps présents dans l'échantillon se lient aux puits recouverts. Le conjugué (anti-IgM humaines couplés à la peroxydase de raifort) est incubé dans les puits pour reconnaître les auto-anticorps liés aux puits recouverts. A la fin de chaque incubation, le matériel non lié est enlevé par aspiration et lavage. Un chromogène est ajouté et les auto-anticorps sont mesurés en utilisant un lecteur de plaque spectrophotométrique. Les concentrations de l'étalon sont de : 3.125; 12.5; 50; 100 MPL, en référence au Standard de Référence du Prof. N. Harris (Louisville University, KY, USA). 1 MPL correspond à 1 μ g/ml de IgM sans affinité. De plus, ils sont calibrés avec les sérum EY2C9 standards Sapporo reconnus internationalement (0,01 μ g équivalant à 10 MPL).

Contenu du Kit de Test:

- 12 x 8 bandelettes de micro-titration recouvertes, préfixées sur le support
- 4 x étalons, prêts à l'emploi 3.125 MPL; 12.5 MPL; 50 MPL; 100 MPL; 1000 μ l chacun. **Remarque: La courbe d'étalonnage doit être préparée pour 4 + 1 étalons; le tampon de dilution de l'échantillon (pré-dilué) est utilisé comme "étalon zéro".**
- 1 x sérum contrôle négatif, prêt à l'emploi; 1000 μ l
- 1 x sérum contrôle positif, prêt à l'emploi; 1000 μ l
- 1 x tampon de dilution de l'échantillon (couleur **ocre**); concentré 5 fois; 20ml
- 1 x solution de conjugué (couleur **verte**); 15ml
- 1 x tampon de lavage; concentré 20 fois; 50ml
- 1 x solution substrat (TMB); 15ml

- 1 x solution d'arrêt, 10 ml
- feuillets de données: gamme de mesure des sérums de contrôle du test
- information produit
- système de pipetage

Réalisation du test:

Nous recommandons l'utilisation de pipettes multicanaux et d'un bac de lavage automatique pour obtenir des durées d'incubation très synchronisées et un haut niveau de performance pour tous les étalons et échantillons utilisés dans le test.

Etapes Préliminaires:

- porter tous les réactifs à température ambiante
- toujours ouvrir l'emballage après avoir atteint la température ambiante
- diluer le tampon de dilution de l'échantillon (couleur **ocre**) (1 part) avec de l'eau distillée (4 parts). Volume total = 100ml
- diluer le tampon de lavage (1part) avec de l'eau distillée (19 parts). Volume total= 1000 ml
- les sérums patients doivent être dilués au 1:101 avant utilisation. Distribuer 10µl de l'échantillon dans 1 ml de tampon d'échantillon dilué (couleur **ocre**).
- les étalons sont prêts à l'emploi
- les sérums de contrôle positif et négatif sont prêts à l'emploi
- la solution de conjugué (couleur **verte**) est prête à l'emploi
- le chromogène (TMB) doit être utilisé sans aucune influence de la lumière. Après utilisation, il doit être conservé à l'abri de la lumière
- les bandelettes non utilisées doivent être rapidement replacées dans l'emballage avec le dessiccateur, refermer et conserver entre 2 et 8°C.

Manipuler la solution d'arrêt avec prudence! Acide Sulfurique!

Mode Opérateur:

- **100µl d'échantillons de patients dilués, d'étalons non dilués et de sérums de contrôle non dilués** sont pipetés dans les puits. Il est recommandé de réaliser plusieurs déterminations et "blancos" (tampon de dilution de l'échantillon couleur **ocre**, pré-dilué)
- incubé **30 minutes** à température ambiante
- rincer la plaque de micro-titration trois fois en utilisant au moins 300µl de tampon de lavage pour chaque puit et chaque étape de lavage. Enlever les traces du tampon restant hors des puits en passant soigneusement un papier absorbant après le dernier lavage. Attention: un lavage et une aspiration incomplets des puits peuvent entraîner une diminution de précision.
- ajouter **100µl de conjugué** (solution couleur **verte**) à chaque puit
- incubé **30 minutes** à température ambiante
- éliminer des puits le conjugué non lié et laver la plaque comme décrit ci-dessus.
- ajouter **100µl de chromogène** (TMB) à chaque puit
- incubé **30 minutes** à l'abri complet de la lumière et à température ambiante
- ajouter **50µl de solution d'arrêt** dans le même ordre que le chromogène
- déterminer l'extinction optique à **450nm** dans les 30 min après l'arrêt de la réaction

Evaluation du Test:

Les absorbances déterminées pour les points d'étalonnage sont indiquées par rapport aux concentrations des solutions standard de façon semi-logarithmique (3.125 MPL; 12.5 MPL; 50 MPL; 100 MPL). Une courbe d'étalonnage est ensuite obtenue en dessinant la ligne d'ajustement (quatre paramètres) passant sur les points. Lire la concentration de chaque composé à analyser directement à partir de la courbe d'étalonnage.

Les valeurs de cardiopline-IgM inférieures à 8 MPL sont considérées négatives. Cut-off = 8 MPL

L'interprétation des résultats dépend de l'application clinique spécifique du test: chaque laboratoire devrait établir ces propres gammes de signification clinique pour la population prise en considération. Un échantillon avec des niveaux d'anticorps douteux devrait être testé à nouveau; s'il reste douteux, le résultat devrait être reporté comme douteux et/ou un échantillon supplémentaire devrait être testé selon l'avis du médecin.

Le test peut être évalué si le résultat du contrôle positif est compris dans une gamme indiquée sur le feuillet de données et si en même temps, le contrôle négatif se trouve aussi en dessous de la valeur "Cut-Off".

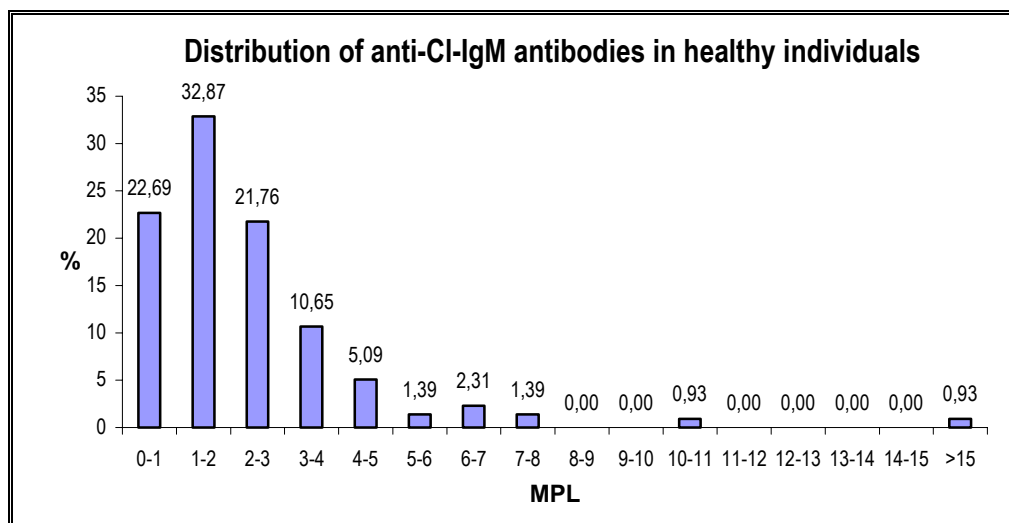
Précautions:

Pour diagnostic in vitro uniquement! Les standards et les sérums de contrôle sont d'origine humaine. Les sérums ont été testés et sont négatifs pour l'HBsAg, l'Hépatite C et le VIH. Toutefois, tous les réactifs doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent donc être manipulés avec les précautions nécessaires. Les règles de manipulation des sérums humains doivent être respectées.

Avertissement: Certains réactifs contiennent de l'Azide de Sodium. L'Azide de Sodium peut former des Azotures Métalliques hautement explosifs avec le plomb et le cuivre présents notamment dans les canalisations. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination des restes de réactifs. Certains réactifs contiennent de petites quantités de Thimérosal (<0.1% p/v). Le substrat contient du 3,3', 5,5' de Tétraméthylbenzidine. La solution d'arrêt contient 2,6% d'Acide Sulfurique. Manipuler donc tous ces composants comme des agents potentiellement dangereux.

Technical Data: Cardiolipin-IgM 11013

1. Distribution of anti-Cardiolipin-IgM antibodies in healthy individuals



Specificity %	number	MPL/ml	Recommended Cut-off
≥ 95%	209	<7	
≥ 99%	214	<11	8 MPL/ml

2. Precision

Repeatability (n=24)				Reproducibility (n=72)			
	1	2	3		1	2	3
Mean	51.7	33.8	21.2	Mean	51.6	34.6	20.3
S.D.	2.13	1.61	0.94	S.D.	2.79	1.83	1.48
C.V.	4.13	4.76	4.43	C.V.	5.40	5.30	7.29

3. Dilution

Dilution				Dilution of Sapporo EY2C9		
	Expected MPL	Measured MPL	Recovery %		OD	EY2C9 µg/ml
		128.5		1 : 100	1.79	0.156
1 : 1				1 : 200	1.48	0.078
1 : 2	64.2	64.7	100.7	1 : 400	1.10	0.039
1 : 4	32.1	33.3	103.8	1 : 800	0.73	0.0195
1 : 8	16.1	16.2	100.7	1 : 1600	0.40	0.00975

Explanation of symbols / Significato dei simboli / Explication des symboles / Bedeutung der Symbole/ Explicación de los símbolos / Explicação dos símbolos / Επεξήγηση των συμβόλων

	For XX tests / Per XX dosaggi / Pour XX dosages / Für XX Bestimmungen / Para XX ensayos / Para XX testes / Περιεχόμενο επαρκές για XX εξετάσεις.
	Consult instructions for use / Leggere le istruzioni per l'uso / Lire la notice d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten / Consulte las instrucciones de uso / Consulte as instruções de utilização / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	Use by / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Verwendbar bis / Use antes de / Utilizar em / Ημερομηνία λήξης.
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Temperaturgrenzen / Límites de temperatura / Límites de temperatura / Περιορισμοί θερμοκρασίας.
	Manufacturer / Fabbrikante / Fabricant / Hersteller / Fabricante / Κατασκευαστής.
IVD	In vitro diagnostic / Diagnostico in vitro / Diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnóstico in vitro / In Vitro .ιαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν.
LOT	Batch code / Codice del lotto / Code du lot / Chargenbezeichnung / Código de lote / Código do lote / Αριθμός Παρτίδας.
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Bestellnummer / Número de catálogo / Αριθμός καταλόγου.
BUF WASH 20x	Wash buffer / Tampone di lavaggio / Tampon de lavage / Waschpuffer / Tampon de lavado / Tampão de lavagem / Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.
CAL	Calibrator / Calibratore / Etalon / Kalibrator / Calibrador / Μέσο βαθμονόμησης.
ENZ CONJ	Enzyme tracer / Tracciante enzimatico / Traceur enzymatique / Enzymkonjugat / Trazador enzimático / Conjugado enzimático / Ενζυματικός ιχνηθέτης.
CONT	Kit contents / Contenido del kit / Contenu de la trousse / Inhalt des Kits / Contenido del kit / Conteúdo do dispositivo / Περιεχόμενα συσκευασίας.
CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Negatives Kontrollserum / Control negativo / Controllo negativo / Αρνητικό πρότυπο ελέγχου.
CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Positives Kontrollserum / Control positivo / Controllo positivo / Θετικό πρότυπο ελέγχου.
DIL SPE 5x	Specimen diluent / Diluente campioni / Diluant pour échantillons / Probenpuffer / Diluyente de muestras / Diluente das amostras / .ιαλύτης δειγμάτων.
SOLN STOP	Stop solution / Soluzione di stop / Solution d'arrêt / Stopplösung / Solución de paro / Solução de paragem / Ανασχετικό διάλυμα.
SORB	Coated strips (solid phase) / Strip sensibilizzate (fase solida) / Barrettes revêtues (phase solide) / Beschichtete Streifen (feste Phase) / Tiras recubiertas (fase sólida) / Tiras sensibilizadas (fase sólida) / Επικαλυμμένες λωρίδες [strip] (στερεά φάση).
SUBS TMB	Chromogen (Tetramethylbenzidine) & Substrate / Cromogeno (Tetrametilbenzidina) & Substrato / Cromogène (Tétraméthylbenzidine) & Substrat / Chromogen (Tetramethylbenzidin) & Substrat / Cromógeno (Tetrametilbencidina) & Sustrato / Cromogénio (Tetrametilbenzidina) & Substrato/ Χρωμογόνο (Τετραμεθυλβενζιδίνη) & Υπόστρωμα.



Dr•Fenning
BioMed GmbH

fr-elisa Cardiolipin-IgM, Sept 2009

CE Dr. Fenning BioMed GmbH
Ottenstr.6a, 79199 Kirchzarten/Germany
Tel. +49 7661 9331-0
info@fenningbiomed.de/com