







REF 41425 	ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM	Distribué par 
INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION	   100	

INDICATION

Le test *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* est un test immunologique chimioluminescent (CLIA) pour la détermination quantitative, avec l'appareil *ZENIT RA Analyser*, des anticorps spécifiques de classe IgM dirigés contre la cardiolipine, dans des échantillons de sérum ou plasma humain (EDTA, Héparine).

Ce dosage est utilisé comme auxiliaire de diagnostic dans l'évaluation du syndrome d'anti-phospholipides (APS).

ATTENTION: Toute décision médicale ne peut être basée sur le résultat de ce seul test, mais doit être fondée sur l'évaluation de l'ensemble des données cliniques et de laboratoire disponibles.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La présence d'anticorps anti-phospholipides (aPL) chez des patients avec thromboses veineuses et/ou artérielles ou chez des patients avec des complications obstétriques est le marqueur de laboratoire principal (avec le LAC) pour le diagnostic du "syndrome d'anticorps anti-phospholipides (APS)"¹.

Selon les critères de Sapporo, mis à jour en 2006¹, le diagnostic de l'APS peut être défini en présence d'au moins un critère clinique et un de laboratoire.

Les critères de laboratoire prévoient la positivité persistante au fil du temps (12 semaines) à un titre moyen/élevé d'anticorps anti-cardiolipine (aCL) et/ou anticorps anti- β_2 -Glycoprotéine I (a β_2 GPI) et/ou anticorps "lupus anticoagulant" (LAC).

Les anticorps aCL et a- β_2 GPI peuvent être d'isotype G ou bien M et avoir un titre supérieur à 40 U/mL.

La présence d'anticorps anti-phospholipides fut démontrée pour la première fois en 1941 dans des échantillons de patients avec diagnostic sérologique de syphilis². On démontra que le sérum de ces patients interagissait avec le phospholipide cardiolipine, contenu dans les extraits de cœur de boeuf du test VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) considéré spécifique pour le diagnostic de la syphilis.

La spécificité du dosage VDRL fut mise en discussion par un nombre important de faux positifs dans des échantillons de patients avec des maladies auto-immunitaires systémiques et en absence de maladies vénériennes. En 1983, Harris et al.³, utilisant une méthode à sensibilité élevée pour la détermination des anticorps anti-cardiolipine, trouvèrent chez 61 % des patients avec LES des concentrations élevées de aCL, démontrant une corrélation significative entre niveaux d'anticorps et les thromboses veineuses et artérielles, le "lupus anticoagulant" et la thrombocytopénie.

En 1990, deux groupes indépendants de chercheurs^{4,5} ont démontré que pour mettre en évidence les

anticorps anti-cardiolipine, la présence de la β_2 -Glycoprotéine I est indispensable.

La β_2 -Glycoprotéine I a un poids moléculaire d'environ 50 kDa, une concentration plasmatique d'environ 0.15-0.30 mg/mL et une fonction biologique peu claire encore aujourd'hui (elle semble capable de moduler le métabolisme des lipoprotéines, d'interférer dans certaines réactions de coagulation et avoir un effet anti-agrégant plaquettaire⁶⁻⁹). Des études cristallographiques récentes ont défini la structure tridimensionnelle de la protéine et son organisation en 5 domaines¹⁰⁻¹¹, fournissant des informations utiles sur le fonctionnement de cette molécule.

En particulier, le domaine V présente de nombreux résidus de lysine qui sont responsables de l'interaction électrostatique de la β_2 -Glycoprotéine I avec les phospholipides anioniques des membranes cellulaires¹². A travers le même mécanisme, a lieu "in vitro" la liaison entre la β_2 -Glycoprotéine et la cardiolipine adsorbée sur la phase solide. Il a été largement démontré que les anticorps anti-cardiolipine de patients avec syndrome d'anticorps anti-phospholipides reconnaissent une portion modifiée de la β_2 -Glycoprotéine I; ces auto-anticorps ne sont pas capables de reconnaître la cardiolipine, la β_2 -Glycoprotéine native non liée à des phases solides ou à d'autres structures^{4,5,13-15}.

Les connaissances acquises jusqu'à présent nous permettent de définir les anticorps anti-cardiolipine comme des anticorps capables de se lier à des néoépitopes par la liaison entre la β_2 -Glycoprotéine et la cardiolipine adsorbée sur une phase solide.

Il a été ensuite démontré^{4,16} que les anticorps anti-cardiolipine chez des patients avec des maladies auto-immunitaires peuvent reconnaître la β_2 -Glycoprotéine I directement adsorbée sur des microplaques de polystyrène, traité aux UV ou irradié. Dans ce cas également, la reconnaissance de la molécule de la part des auto-anticorps est déterminée par les modifications structurelles causées par la liaison de la protéine à la phase solide.

PRINCIPE DE LA METHODE

Le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* pour la détermination quantitative des IgM spécifiques anti-cardiolipine, dépendants de la β_2 -Glycoprotéine I, utilise une méthode immunologique indirecte à deux étapes basée sur le principe de la chimioluminescence.

Le complexe cardiolipine- β_2 -Glycoprotéine I est utilisé pour revêtir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps anti-IgM humaines est marqué avec un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué).

Durant la première incubation, les anticorps spécifiques se trouvant dans l'échantillon, dans les calibrateurs ou dans les contrôles se lient à la phase solide.

Durant la deuxième incubation le conjugué réagit avec les anticorps anti-cardiolipine IgM séquestrés par la phase solide.

Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est enlevé à travers aspiration et lavage successif.

La quantité de conjugué marqué restant lié à la phase solide est évaluée à travers l'activation de la réaction de chimioluminescence et mesure du signal lumineux. Le signal généré, exprimé en unités relatives de lumière (RLU, Relative Light Unit), est indicatif de la concentration des anticorps spécifiques dans l'échantillon, les calibrateurs et les contrôles.

AUTOMATISATION

L'appareil *ZENIT RA Analyser* réalise en automatique toutes les opérations prévues par le protocole de dosage: ajout dans le récipient de réaction des échantillons, calibrateurs, contrôles, particules magnétiques, conjugué et solutions d'activation de la chimioluminescence; séparation magnétique et lavage des particules ; mesure de la lumière émise.

Le système calcule les résultats du dosage pour les échantillons et les contrôles à travers une courbe de calibration mémorisée et imprime un rapport qui inclut toutes les informations relatives au dosage et au patient.

MATERIELS ET REACTIFS

Matériels et réactifs fournis

REAG	1	MP	2.5 mL
------	---	----	--------

Particules magnétiques revêtues avec le complexe cardiolipine- β_2 -Glycoprotéine I dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes, un tensioactif, du Pro-Clin 300 et de l'azide de sodium (< 0.1 %) comme conservateurs.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Anticorps monoclonal de rat anti-IgM humaines marqué par un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué), dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes et de l'azide de sodium (< 0.1 %) comme conservateur.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Solution de Dilution Echantillons: Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO₄ comme conservateurs.

REAG	4	CAL A	1.6 mL
------	---	-------	--------

Sérum humain à faible concentration en anticorps anti-cardiolipine IgM dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO₄ comme conservateurs.

REAG	5	CAL B	1.6 mL
------	---	-------	--------

Sérum humain à forte concentration en anticorps anti-cardiolipine IgM dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO₄ comme conservateurs

Tous les réactifs sont prêts à l'usage.

Les réactifs 1, 2 et 3 sont assemblés en un seul ensemble qui constitue la cartouche réactifs.

Les concentrations des Calibrateurs sont exprimées en MPL/mL (Unités MPL) et tarées par rapport aux standards de référence "Harris". Les valeurs des concentrations, spécifiques par lot de produit, sont enregistrées dans le DATA DISK inséré dans le kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenant les informations concernant tous les produits de la ligne ZENIT RA (Réactifs, Calibrateurs, Sérums de contrôle) mises à jour au dernier lot de production à l'exclusion des produits périmés à la date de compilation du nouveau DATA DISK.

Il suffit de conserver le DATA DISK avec le numéro de lot le plus élevé pour maintenir à jour les informations nécessaires pour le fonctionnement correct du système.

Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis dans le kit

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| - Appareil ZENIT RA | Code. No. 41400 |
| - Cube Cuvette ZENIT RA *
Emballage de 960 cuvettes. | Code No. 41402 |
| - Liquide Système ZENIT RA *
1 bouteille de 0.5 litre de solution 10x. | Code No. 41409 |
| - Solution de Lavage ZENIT RA *
1 bouteille de 0.5 litre de solution 20x. | Code No. 41407 |
| - Set Trigger ZENIT RA *
1 flacon de 250 mL de Trigger A (solution de préactivation)
1 flacon de 250 mL de Trigger B (solution d'activation) | Code No. 41403 |
| - Solution D-SORB ZENIT RA | Code No. 41436 |

Emballage de 2 bouteilles de 1 litre de solution prête à l'usage.

- Système Vérification Cartouche ZENIT RA * Code No. 41401
- Top Cap Set ZENIT RA Code No. 41566
300 bouchons supérieurs pour la fermeture des récipients des calibrateurs après la première utilisation.

(*) L'appareil ZENIT RA Analyzer et les accessoires identifiés par l'astérisque sont fabriqués par Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgique et distribués par A. Menarini Diagnostics Srl.

Autres Réactifs recommandés

SET DE CONTROLE APS IgM ZENIT RA Code No. 41454
3 flacons de 1.5 mL de sérum humain négatif et 3 flacons de 1.5 mL de sérum humain positif pour anticorps anti-cardiolipine.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Les réactifs fournis dans le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* sont exclusivement pour usage diagnostic *in vitro* et non pour usage *in vivo* chez l'homme ou les animaux.

Ce produit doit être utilisé par des utilisateurs professionnels en respectant strictement les instructions reportées dans ce document.

La société Menarini ne peut être tenue responsable de pertes ou dommages dus à une utilisation non conforme aux instructions fournies.

Précautions de sécurité

Ce produit contient du matériel d'origine animale et doit donc être manipulé comme s'il contenait des agents infectieux.

Ce produit contient du matériel d'origine humaine. Toutes les unités de sérum ou de plasma utilisées pour la fabrication des composants du Set de Contrôle ont été analysées par des méthodes approuvées par la FDA et ont résulté non réactives à la présence de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 et anti-HIV2.

Cependant, vu qu'aucune méthode d'analyse n'est capable de garantir l'absence d'agents pathogènes, tout le matériel d'origine humaine doit être considéré potentiellement infectieux et manipulé comme tel.

En cas d'emballage endommagé avec déversement des réactifs, effectuer la décontamination de la zone intéressée avec une solution diluée d'Hypochlorite de Soude après s'être protégé avec des dispositifs de protection individuelle (tablier, gants, lunettes).

Effectuer l'élimination du matériel utilisé pour le nettoyage et des déchets d'emballage impliqués dans le déversement sur base des normes nationales pour l'élimination des déchets potentiellement infectés.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Etant donné que l'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton plombé en formant des azides explosifs dans les canalisations, il est recommandé de ne pas éliminer les réactifs ou les déchets dans les égouts mais de suivre les normes nationales en matière d'élimination des déchets potentiellement dangereux.

Précautions opérationnelles

Pour obtenir des résultats fiables, il faut s'en tenir étroitement à ces Instructions pour l'utilisation et suivre scrupuleusement ce qui est indiqué dans le manuel opérationnel de l'appareil.

Les réactifs fournis dans le kit doivent être utilisés exclusivement avec le système *ZENIT RA Analyzer*.

Les composants de la cartouche réactifs ne peuvent être enlevés de la cartouche et réassemblés.

Ne pas utiliser le kit après la date de péremption.

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs fournis dans le kit sont prêts à l'usage.

CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs fournis dans le kit entre 2-8 °C en position verticale et à l'obscurité.

Dans ces conditions, la cartouche réactifs et les calibrateurs non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption.

Après ouverture, la cartouche réactifs peut être utilisée pendant 60 jours si conservée au frigo entre 2-8 °C ou bien dans la machine.

Après ouverture, les calibrateurs peuvent être utilisés pendant 60 jours si conservés au frigo entre 2-8 °C ou bien si la permanence dans la machine ne dépasse pas les 6 heures par séance.

Ne pas congeler les réactifs et les calibrateurs.

PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le dosage doit être effectué sur des échantillons humains de sérum et plasma (EDTA - Héparine).

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés et troubles est déconseillée.

Si le dosage est effectué après plus de 8 heures du prélèvement, séparer le sérum du caillot ou le plasma des globules rouges en le transférant des éprouvettes primaires de séparation avec gel dans les éprouvettes secondaires sans additifs.

Avant d'être analysés, les échantillons peuvent être conservés au frigo entre 2-8 °C pendant maximum 7 jours.

Si le dosage est réalisé après plus de 7 jours, conserver les échantillons congelés (< - 20 °C).

Eviter les congélations et décongélations répétées.

PROCEDURE

Pour obtenir des prestations analytiques fiables, s'en tenir scrupuleusement aux instructions reportées dans le manuel opérationnel de cet appareil.

Chargement des réactifs

Tous les réactifs fournis dans le kit sont prêts à l'usage.

Avant d'insérer la cartouche réactifs dans le système, le récipient des particules magnétiques doit être agité par rotation horizontalement de façon à favoriser la remise en suspension des particules. Réaliser l'opération en évitant la formation de mousse.

Placer la cartouche réactifs dans la zone réactifs de l'appareil en utilisant la glissière prévue et laisser en agitation pendant au moins 30 minutes avant l'utilisation.

Le positionnement de la cartouche réactifs détermine en même temps la lecture du code à barres d'identification. Si l'étiquette de la cartouche est endommagée ou en cas de non lecture, les données d'identification peuvent être insérées manuellement.

L'appareil maintient automatiquement en agitation continue les particules magnétiques.

Si la cartouche réactifs est enlevée de l'appareil, la conserver verticalement, à l'obscurité et entre 2-8 °C.

Chargement des calibrateurs et des contrôles

Les calibrateurs et les contrôles ZENIT RA sont prêts à l'usage. Laisser les calibrateurs et les contrôles à température ambiante pendant 10 minutes. Agiter délicatement le contenu, manuellement ou au moyen du vortex, en évitant la formation de mousse. Ne pas retourner le récipient et ne pas enlever le bouchon perforateur de fermeture (bouchons jaunes pour les calibrateurs et bouchons verts ou bleus pour les contrôles).

Au cas où l'on utilise les calibrateurs ou les contrôles pour la première fois, enfoncer le bouchon perforateur à fond vers le bas. Par cette opération, la membrane qui scelle le récipient sera perforée en rendant possible le prélèvement du liquide qui y est contenu. L'abaissement du bouchon perforateur est signalé par la couverture simultanée de la bande de couleur rouge se trouvant sur le côté supérieur de l'étiquette. (Voir Fig. 1 – Récipient scellé et Récipient perforé).

Au cas où les calibrateurs ou les contrôles ont déjà été utilisés auparavant, le récipient sera équipé du bouchon supérieur de fermeture (bouchon blanc) et la bande rouge de l'étiquette sera recouverte.

On ne peut charger sur l'appareil qu'exclusivement les récipients sans bouchon supérieur et avec la bande rouge recouverte (Voir Fig. 1 – Récipient perforé).

Insérer dans l'appareil les calibrateurs ou les contrôles dans la zone échantillons après lecture du code à barres. Les données du code à barres peuvent aussi être insérées manuellement en cas d'étiquette endommagée ou en cas de non lecture.

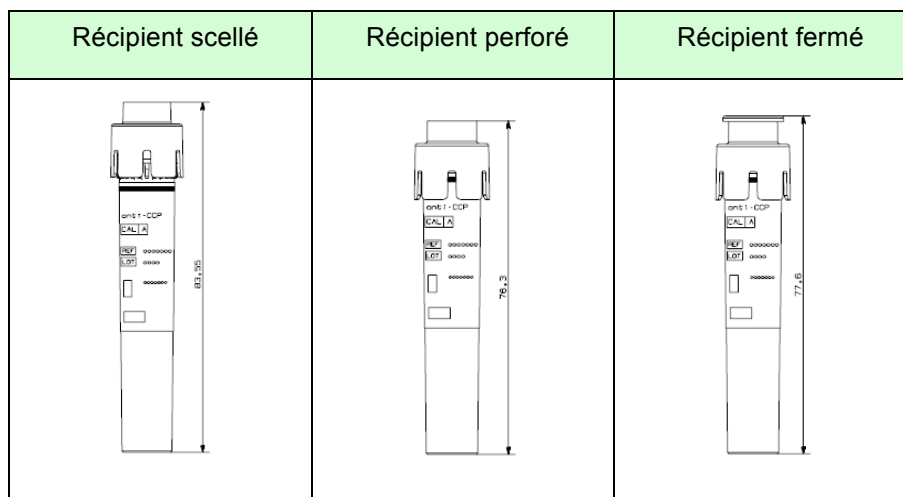
Les valeurs de la concentration des anticorps IgM anti-cardiolipine se trouvant dans les calibrateurs ou dans

les contrôles sont enregistrées dans le DATA DISK et automatiquement transférées à l'analyseur. En cas d'absence de transfert des données, on peut les insérer manuellement.

A la fin de la séance, les récipients des calibrateurs et des contrôles doivent être refermés avec les bouchons supérieurs prévus (bouchons blancs) et transférés à 2-8 °C jusqu'à leur utilisation successive (Voir Fig. 1 – Récipient fermé).

Les calibrateurs peuvent être utilisés au maximum quatre fois.

Figure 1: Layout récipient



Chargement des échantillons

Identifier les échantillons en utilisant le lecteur code à barres et les placer dans l'appareil, dans le récipient prévu. En cas d'absence de code à barres sur l'échantillon ou en cas de non lecture, les données d'identification de l'échantillon peuvent être insérées manuellement.

Sélectionner pour chaque échantillon les paramètres requis.

Calibration

L'appareil *ZENIT RA Analyzer* utilise une courbe de calibration mémorisée (courbe maîtresse), générée par le producteur pour chaque lot de cartouche réactifs.

Les paramètres des "courbes maîtresses", ainsi que les valeurs des concentrations des calibrateurs, sont mémorisées dans le DATA DISK et transférées dans la base de données de l'appareil.

Les calibrateurs A et B sont utilisés pour recalibrer la "courbe maîtresse" en fonction tant de l'appareil utilisé que des réactifs à bord.

Pour réaliser la recalibration, analyser en triple les deux calibrateurs A et B et en simple les contrôles. Les valeurs de concentration obtenues avec les contrôles permettent de valider la nouvelle calibration.

Une fois que la recalibration de la "courbe maîtresse" a été acceptée et mémorisée, tous les échantillons successifs peuvent être analysés sans calibration supplémentaire, sauf dans les cas suivants:

- quand on charge à bord de l'appareil une cartouche réactifs avec un nouveau lot;
- quand les valeurs des contrôles ne rentrent pas dans l'intervalle d'acceptabilité;

- quand on effectue la procédure d'entretien de l'appareil;
- quand la validité de la "courbe maîtresse" recalibrée est périmée.

La validité de la "courbe maîtresse" recalibrée pour le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* est de 15 jours.

La gestion de la recalibration est mise en œuvre en automatique par l'appareil.

Dosage

Appuyer sur la touche de mise en route.

1. Le système aspire 100 µL de Diluant Echantillons, 20 µL de Particules Magnétiques, 100 µL de Diluant Echantillons et 6 µL d'échantillon ou contrôle (pour les calibrateurs, le sérum positif est fourni pré-dilué avec le Diluant Echantillons et le volume prélevé est de 106 µL). Les solutions et la suspension sont distribuées dans la cuvette de réaction.
2. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
3. Après cette phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées.
4. Dans la cuvette, on distribue 200 µL de conjugué.
5. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
6. Après cette dernière phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées et la cuvette est transférée dans la chambre de lecture.
7. La quantité de conjugué lié à la phase solide, exprimée en RLU, est directement proportionnelle à la concentration en IgM anti-cardiolipine se trouvant dans l'échantillon.
8. Les réponses obtenues sont interpolées sur la courbe de tarage et transformées en concentrations.

Les échantillons avec des valeurs de concentration plus élevées que la limite supérieure de l'intervalle de mesure peuvent être dilués et retestés. La nouvelle valeur obtenue est multipliée, pour obtenir le résultat final, par le facteur de dilution utilisé.

CONTROLE QUALITE

Pour assurer la validité du dosage, on doit mesurer des sérums de contrôle à différents niveaux de concentration (au moins un sérum négatif et un sérum positif) chaque jour où l'on effectue un dosage.

Si le laboratoire demande, pour la vérification des résultats du dosage, une utilisation plus fréquente ou un nombre plus élevé de contrôles, effectuer les procédures de contrôle qualité qui y sont établies.

Si l'on utilise des sérums de contrôle ZENIT RA, les valeurs attendues moyennes et les limites d'acceptabilité sont celles reportées dans le DATA DISK se trouvant également dans l'emballage des contrôles.

Si l'on utilisait des sérums de contrôle différents, il faut, avant leur utilisation, définir les valeurs attendues avec les réactifs et le système ZENIT RA.

Si la valeur des contrôles ne rentrait pas dans l'intervalle d'acceptabilité spécifié, les résultats relatifs du dosage ne seraient pas valides et les échantillons respectifs devraient être analysés à nouveau.

Dans ce cas, il faut réaliser une procédure de recalibration avant la répétition du dosage.

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Calcul des résultats

La concentration des anticorps IgM anti-cardiolipine se trouvant dans les échantillons en examen est calculée automatiquement par le système. Les valeurs peuvent être visualisées à travers lecture sur l'écran ou impression.

Les concentrations sont exprimées en MPL U/mL.

Le calcul de la concentration en analyte de l'échantillon se fait à travers lecture de la réponse obtenue pour chaque échantillon sur une courbe de calibration élaborée à travers un système de "fitting" logistique à quatre paramètres (4PL, Y pondéré), corrigée périodiquement en fonction des réponses obtenues dans le dosage des calibrateurs.

Pour des informations détaillées sur comment le système calcule les résultats, consulter le manuel opérationnel du système.

Interprétation des résultats

La gamme de mesurabilité du dosage *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* est: 0.0 – 300 MPL U/mL.

Les valeurs inférieures à 0.0 MPL U/mL sont des valeurs extrapolées et peuvent être reportées comme "égales à 0.0 MPL U/mL".

Les valeurs supérieures à 300 U/mL peuvent être reportées comme "supérieures à 300 MPL U/mL", ou testées à nouveau après dilution.

Les résultats des échantillons peuvent être interprétés de la façon suivante:

(MPL U/mL)	Interprétation
< 10	L'échantillon doit être considéré Négatif pour la présence de IgM anti-cardiolipine
≥ 20	L'échantillon doit être considéré Positif pour la présence de IgM anti-cardiolipine

Les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées uniquement comme valeurs suggérées. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles de référence.

LIMITES DU DOSAGE

Pour établir un diagnostic, les résultats obtenus avec le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* et le système *ZENIT RA Analyzer* doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et de laboratoire à la disposition du médecin.

La contamination bactérienne des échantillons et l'inactivation à la chaleur peuvent influencer le résultat du dosage.

Les anticorps hétérophiles se trouvant dans les échantillons de sérum humain peuvent réagir avec les

réactifs à base d'immunoglobulines, causant des interférences dans les dosages immunologiques in vitro. Ces échantillons peuvent donner lieu à des valeurs anormales si analysés avec le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM*.

VALEURS ATTENDUES

On a analysé les échantillons de 99 donneurs sélectionnés au hasard pour vérifier la présence d'anticorps IgM anti- cardioline.

Tous les échantillons analysés étaient négatifs, avec une valeur moyenne de 1.3 MPL U/mL et une déviation standard de 1.48 MPL U/mL.

Avec les résultats obtenus, on a calculé la "Limit of Blank" (LoB = la plus haute valeur que l'on puisse attendre dans une série d'échantillons qui ne contiennent pas l'analyte). La "Limit of Blank", déterminée comme le 95^e percentile de la population négative, était égal à 4.3 MPL U/mL avec le lot de réactifs n° 2.

SENSIBILITE ET SPECIFICITE CLINIQUE

On a testé avec le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* un total de 344 échantillons dont 68 échantillons de patients atteints du syndrome d'anticorps anti-phospholipides (APS), 46 échantillons de patients atteints de maladies auto-immunitaires systémiques rhumatoïdes (7 conjonctives, 15 lupus érythémateux systémique, 24 arthrite rhumatoïde), 30 échantillons de patients atteints de diverses pathologies infectieuses (5 HIV, 7 HBV, 18 HCV), 100 échantillons de sujets normaux et 100 échantillons de donneurs.

Dans la population présumée négative (46 échantillons de patients atteints de maladies auto-immunitaires systémiques rhumatoïdes, 30 échantillons de patients atteints de diverses pathologies infectieuses, 100 échantillons de sujets normaux et 100 échantillons de donneurs) étudiée, 7 échantillons étaient positifs et 269 négatifs.

- **Spécificité diagnostique: 97.5 % (269/276)**

Dans la population présumée positive (68 échantillons de patients atteints du syndrome d'anticorps anti-phospholipides) étudiée, 41 échantillons étaient négatifs et 27 positifs.

- **Sensibilité diagnostique: 39.7 % (27/68)**

Sur base des résultats de la spécificité et de la sensibilité diagnostique, l'**accord diagnostique est de 86.0 % (296/344)**.

Des 68 échantillons de patients atteints du syndrome d'anticorps anti-phospholipides, 58 échantillons étaient positifs avec le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgG* (85.3 %).

PRESTATIONS

Avertissement: les données présentées ne représentent pas les spécifications de fonctionnement du kit, mais constituent une démonstration expérimentale de comment fonctionne le kit dans ces spécifications de la façon prévue par le producteur.

Précision et Reproductibilité

La précision et reproductibilité du kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* ont été évaluées en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP5-A2 de la Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **précision** a été calculée en analysant les résultats de 20 réplifications de cinq sérums (un négatif et quatre positifs avec différentes concentrations de anti-cardiolipine IgG) réalisées avec deux lots différents de réactifs lors de la même séance expérimentale.

La concentration du sérum anti-cardiolipine IgM négatif (N3) était comprise dans l'intervalle de 0.0 à 0.0 MPL U/mL et de 0.0 à 0.0 MPL U/mL respectivement avec le lot de réactif n° 1 et n° 2.

Dans le tableau se trouvent les résultats obtenus avec les 4 sérums positifs.

Echantillon	Lot réactif n°	Concentration moyenne (MPL U/mL)	DS	CV %
P1	1	22.2	1.16	5.2
	2	20.8	0.92	4.4
P2	1	47.8	2.50	5.2
	2	44.8	1.06	2.4
P3	1	88.3	5.94	6.7
	2	87.2	3.54	4.1
P4	1	182.2	7.83	4.3
	2	176.3	4.07	2.3

La **reproductibilité** a été calculée en analysant les résultats de la détermination de cinq sérums (un négatif et quatre positifs avec différentes concentrations de anti-cardiolipine IgM) réalisée en simple, en 30 séances différentes, avec deux lots de réactifs différents.

La concentration du sérum anti-cardiolipine IgM négatif (N3) était comprise dans l'intervalle de 0.0 à 2.3 MPL U/mL.

Dans le tableau se trouvent les résultats obtenus avec les 4 sérums positifs.

Echantillon	Concentration moyenne (MPL U/mL)	DS	CV %
P1	22.9	2.14	9.3
P2	54.6	4.15	7.6
P3	131.2	8.79	6.7
P4	162.2	14.68	9.1

Linéarité des Dilutions

La linéarité des dilutions du kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* a été évaluée en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP6-A de la Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

On a dosé des dilutions scalaires de 3 sérums à concentration élevée de IgM anti-cardiolipine, réalisées avec le Diluant Echantillons.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant.

Echantillon	Facteur de dilution	Concentration mesurée (MPL U/mL)	Concentration attendue (MPL U/mL)	Recouvrement %
1	1	86.5	-	(100)
	2	40.6	43.3	93.8
	4	20.7	21.6	95.8
2	1	202.8	-	(100)
	2	81.0	101.4	79.9
	4	39.9	50.7	78.7
	8	19.0	25.4	74.8
3	1	64.4	-	(100)
	2	33.5	32.2	104.0
	4	16.1	16.1	100.0

Il faut dans tous les cas souligner que tous les sérums, quand ils sont mesurés à des dilutions différentes, ne peuvent fournir des résultats linéaires à l'intérieur de l'intervalle de mesurabilité car le résultat dépend non seulement de la concentration mais aussi de l'affinité des anticorps se trouvant dans l'échantillon.

Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique du kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM*, exprimée comme **limite de détection** (*Limit of Detection – LoD*: c'est à dire la plus petite quantité d'analyte que la méthode est capable de mesurer) a été évaluée en utilisant un protocole basé sur les lignes de conduite du document EP17-A de la Clinical and Laboratory Standards (CLSI) et la formule pour le calcul $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (où LoB représente la valeur de la "Limit of Blank", SD_s la déviation standard estimée de la distribution de l'échantillon à faible concentration et C_{β} est dérivé du 95 ° percentile de la distribution standard gaussienne).

On a utilisé 4 échantillons à faible concentration en analyte, déterminés en simple avec deux différents lots de réactifs en 15 expériences différentes.

La limite de détection du kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgG* est de 6.8 MPL U/mL.

Les valeurs de la limite de détection, ainsi que les considérations de caractère clinique et les résultats de comparaison avec des méthodes de référence ont contribué à la définition de la valeur cut-off.

Spécificité Analytique: Interférences

Une étude basée sur les lignes de conduite du document EP7-A2 de la CLSI a démontré que les prestations du dosage ne sont pas influencées par la présence dans l'échantillon des substances potentiellement interférentes reprises dans le tableau suivant, jusqu'à la concentration expérimentée.

Substances potentiellement interférentes	Concentration maximale expérimentée
Bilirubine libre	20 mg/dL
Bilirubine conjuguée	28 mg/dL
Hémoglobine	1000 mg/dL
Acides gras	3000 mg/dL

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles est toutefois déconseillée.

Spécificité Analytique: Réactions croisées

Pour évaluer les réactions croisées potentielles de l'antigène utilisé pour sensibiliser les microparticules, on a mené une étude avec 24 échantillons, tous avec des niveaux élevés d'autres auto-anticorps et négatifs pour les anti-cardiolipine IgM.

Les échantillons utilisés étaient subdivisés comme suit: SS-A (2), SS-B (2), U1-snRNP (1), Jo-1 (3), Scl-70 (2), Cenp B (2), Histones (2), Nucléolaires (1), Gliadine/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (2), MPO (1), PR3 (1).

L'étude n'a montré aucune réaction croisée significative de l'antigène en phase solide avec les autres auto-anticorps.

Effet saturation à fortes doses

Certaines méthodes immunologiques employées pour la détermination d'échantillons contenant l'analyte à des concentrations extrêmement élevées peuvent fournir des niveaux apparents en analyte sous-estimés (Effet hook).

La méthode utilisée dans le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM*, étant une méthode à deux incubations, ne subit pas cet effet.

Un échantillon avec une concentration extrêmement élevée (au-dessus de l'intervalle de mesure) de IgM anti-cardiolipine a confirmé l'absence d'effet "hook" jusqu'à la concentration de 593 MPL U/mL.

Sensibilité et Spécificité Relative

La présence d'anticorps anti-cardiolipine IgM a été déterminée en utilisant le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM* et une méthode de dosage ELISA disponible dans le commerce sur 245 échantillons dont 69 échantillons atteints du syndrome d'anticorps anti-phospholipides (APS), 46 échantillons de patients atteints de maladies auto-immunitaires systémiques rhumatoïdes, 30 échantillons de patients atteints de diverses pathologies infectieuses et 100 échantillons de sujets normaux.

12 échantillons ont donné lieu à des résultats discordants entre le dosage ZENIT RA et le dosage ELISA disponible dans le commerce.

La **concordance relative** est donc de 95.1 % (233/245).

La **sensibilité relative** est de 92.3 % (24/26).

La **spécificité relative** est de 95.4 % (209/219).

Calibration et préparation de référence

Le système est calibré par rapport aux sérums de référence "HARRIS" (Product no. 6495GM, Lot no. 021008), reconnus internationalement.

La quantité d'anticorps anti-cardiolipine IgM se trouvant dans le réactif de référence " Human IgM Anti-Cardiolipin Monoclonal Antibody EY2C9 20 µg/ml (CDC, Cat. No. IS2718, Lot no. 05-0059 09/20/05)", reconstitué avec 0.5 mL (concentration protéique: 20 µg/mL), testée avec le kit *ZENIT RA CARDIOLIPINE IgM*, est de 300 MPL U/mL.

BIBLIOGRAPHIE

1. 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. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1941; 48, 484-486.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2, 1211-1214.
4. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al.. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335, 1544-1547.
5. McNeil HP, Simson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation : β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87, 4120-4127.
6. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2 – glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31, 484-486.

7. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54, 397-401.
8. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al.. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884, 142-149.
9. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 1997; 272, 31113-31117.
10. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink M, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human β 2-Glicoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* 1999; 18, 5166-5174.
11. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassi R. Crystal structure of human β 2-glycoprotein I: implication for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J* 1999; 18, 6228-6239.
12. Hunt JU, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281- Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. *J Immunol* 1994; 152, 653-659.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*, 1990; 336, 177-178.
14. Koike T and Matsuura E. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies ?. *Lancet* 1991; 337, 671-672.
15. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J Immunol*, 1992; 148, 3885-3891.
16. Viard JP, Amoura Z, and Back JF. Association of anti- β 2-glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *AM J Med*, 1992; 93, 181-186.

**TECHNOGENETICS S.r.l.**

Viale Casiraghi 471

20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Italie

FRANCE**Distribué par**

A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L.

3-5, Rue du Jura - BP 70511- 94633 Rungis Cedex

Tél. +33 1 56 34 69 10 - Fax +33 1 56 34 69 11

www.menarinidiagnostics.fr**BELGIQUE et LUXEMBOURG****Distribué par**

Menarini Diagnostics Benelux S.A./N.V.

Belgicastraat, 4 - 1930 Zaventem

Tél. +32 2 72 14 545 - Fax +32 2 72 09 292

www.menarinidiagnostics.be