

QUANTA Lite® aPS/PT IgM ELISA

(anti-phosphatidylserine and prothrombin)

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Complexité CLIA : élevée

REF 708835, 708845

Rx Only

Application

Les kits QUANTA Lite aPS/PT IgG et/ou QUANTA Lite aPS/PT IgM sont des dosages d'immunosorbant liés aux enzymes (ELISA) pour la détection semi-quantitative et qualitative d'anticorps IgG et IgM au complexe phosphatidylsérine/prothrombine dans le sérum et le plasma. Ce dosage est utilisé pour aider à émettre un diagnostic en cas de troubles thrombotiques auto-immunes tels que le syndrome APS (syndrome anti-phospholipide) et les troubles accompagnant le lupus érythémateux disséminé ou autres désordres du type lupus, en conjonction avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

Résumé et explication du test

Les anticorps anti-phospholipide (aPL) représentent un vaste groupe d'immunoglobulines revêtant une importance considérable en raison de leur association avec les thromboses artérielles et/ou veineuses, les fausses couches à répétition, les troubles neurologiques, l'hypertension pulmonaire et la thrombocytopénie.¹ Les anticorps anti-cardiolipine (ACA) détectés par le dosage ELISA et l'anticoagulant circulant (LA) dans les essais de coagulation représentaient les essais les mieux établis et uniformisés pour le diagnostic du syndrome d'anti-phospholipide (APS). La famille des aPL s'est récemment étendue pour inclure un groupe hétérogène d'auto-anticorps dont la spécificité est orientée contre les protéines de liaison des phospholipides ou contre leurs complexes avec les phospholipides.²⁻⁵

Parmi les protéines de liaison des phospholipides, la mieux étudiée est la glycoprotéine β_2 (GPI β_2). La GPI β_2 porte les épitopes cryptiques pour la liaison des ACA exposés lorsque la glycoprotéine β_2 se lie aux phospholipides chargés négativement, tels que la cardiolipine, ou est immobilisée sur des plaques ELISA en plastique irradiées.⁶ Un certain nombre d'étude ont fait ressortir l'importance des anticorps anti-GPI β_2 par dosage ELISA comme alternative au dosage conventionnel des ACA avec une spécificité plus élevée¹¹ et cette méthode a été adoptée par la communauté clinique.

La prothrombine (facteur II) est une autre protéine de liaison du phospholipide avec une masse moléculaire de 72 KDa et présent dans le plasma normal avec une concentration de 2,5 $\mu\text{mol/l}$. La prothrombine exerce une action pro-coagulante par l'intermédiaire d'un complexe à la prothrombinase déclenchant une conversion du fibrinogène en fibrine.¹²

LA a démontré son action contre de multiples protéines plasmatiques, y compris la GPI β_2 et la prothrombine.^{13,15} En 1995, Arvieux et al¹⁶ ont montré que les aPT pouvaient être détectés par dosage ELISA dans des échantillons positifs d'anticoagulant circulant (LA) en utilisant des plaques irradiées de la même façon que pour l'essai anti-GPI β_2 . Les chercheurs ont posé l'hypothèse d'une analogie avec les anti-GPI β_2 : les aPT pouvaient reconnaître des épitopes cryptiques ou des néoépitopes formés par l'interaction de prothrombine avec la surface anionique.

Certains rapports existent relativement à la prévalence d'aPT chez des patients avec des anticorps anti-phospholipides. Arvieux et al¹⁶ ont annoncé une prévalence de 55,4 % chez les patients positifs pour l'anticoagulant circulant. Galli et al¹⁷ ont relevé des aPT chez 58 % des patients avec APS. Petri et al ont publié un rapport préliminaire selon lequel les aPT avaient une valeur prédictive potentielle pour les événements thrombotiques chez 100 patients avec maladie lupique. Horbach et al¹⁹ ont étudié l'importance clinique des aPT chez 175 patients affectés d'une maladie lupique et ont trouvé que les IgG et IgM anti-PT étaient plus fréquents chez les patients avec des antécédents de thrombose et qu'ils étaient associés avec des thromboses veineuses, mais non artérielles. Les titrages d'IGM anti-PT sont légèrement supérieurs chez les patients avec thrombose par rapport à ceux sans thrombose tandis qu'aucune différence n'est relevée dans les titrages des IgG anti-IgG entre les 2 groupes. Vaarala et al²⁰ ont démontré une augmentation de la valeur prédictive de 2,5 fois relativement au risque d'infarctus du myocarde ou d'arrêt cardiaque chez les personnes d'âge moyen avec des niveaux élevés d'anti-PT.

L'association entre les anti-PT et l'anticoagulant circulant a été largement étudié. En 1988, Fleck et al²¹ ont démontré que les anti-PT avaient une action d'anticoagulant circulant. Il a également été démontré que les anticorps responsables de l'action d'anticoagulant circulant (LA) se liaient à la prothrombine dans certaines conditions expérimentales.^{14,22} De plus, Bevers et al¹⁴ ont démontré que la prothrombine était nécessaire pour exprimer l'action LA dans 11/16 échantillons plasmatiques positifs pour l'anticoagulant circulant (LA) et appauvris en ACA, ce qui implique qu'au moins 69 % de l'action LA dépend des anticorps de liaison de la prothrombine. Le mécanisme par lequel ces anticorps agissent n'est pas encore très clair. On a supposé que les anti-PT inhibaient la libération de prostacycline de la cellule endothéliale médiaée par la thrombine ainsi que l'activation de la protéine C.² L'hypothèse a récemment été émise que la prothrombine se liait aux phospholipides anioniques exposés sur les cellules endothéliales et que les anti-PT activaient les cellules endothéliales et induisaient les substances procoagulantes via la prothrombine.²³

Bertolaccini et al²⁴ ont examiné la présence d'IgG et IgM anti-PT par ELISA chez des patients avec maladie lupique. Ces anticorps ont été trouvés chez 28 % des patients atteints de maladie lupique avec 18 % d'entre eux positifs pour les IgG et 14 % positifs pour les IgM tandis que 4 % de ces patients étaient positifs à la fois pour les IgG et les IgM. Ce groupe a dénoté une association entre la présence d'anti-PT et l'occurrence d'événements vasculaires, 53 % des patients avec maladie lupique et anti-PT ayant des antécédents d'événements thrombotiques. Cette étude²⁴ annonçait également une association entre anti-PT et présence d'ACA et d'anti-GPI β_2 , bien que les auteurs déclaraient que les anti-PT par dosage ELISA ne devaient pas être considérés comme un substitut pour les essais conventionnels sur les anticoagulants circulants, ACA et GPI β_2 .

Au cours des dernières années, un tableau plus clair est ressorti quant à l'intérêt clinique des anticorps anti-PT. Nous savons maintenant que les anticorps associés de plus près au syndrome anti-phospholipide et à l'anticoagulant circulant sont, de fait, dirigés contre un complexe de phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine et la prothrombine (PS/PT) plutôt que la PT seulement. Ces données sont clairement reprises dans un récent article de synthèse.²⁵

Un certain nombre d'études a montré que les essais anti-PS/PT avaient un intérêt clinique significatif et étaient plus étroitement liés avec les caractéristiques cliniques du syndrome anti-phospholipide et de l'anticoagulant circulant.²⁵⁻²⁸

Principes du test

Les kits QUANTA Lite aPS/PT (anti-phosphatidylsériste/prothrombine) IgG et QUANTA Lite aPS/PT IgM sont des dosages immune-enzymatiques (ELISA) pour la détection des anticorps IgG et IgM au complexe phosphatidylsériste/prothrombine dans le sérum ou le plasma humain au moyen de la technique immuno-enzymatique en sandwich. Des puits de plaque à micropuits en plastique sont revêtus de complexe PS/PT purifié, puis stabilisés. Après incubation, du sérum contenant des anticorps IgG ou IgM anti-PS/PT se lie avec le PS/PT. Les protéines non liées sont supprimées par lavage et un conjugué d'IgG ou IgM anti-humain marqué à la peroxydase de raiort est ajouté aux puits. Après incubation, le conjugué non lié est supprimé par lavage. Un substrat de peroxydase est ensuite ajouté : ce substrat subit un changement de couleur en présence d'enzyme conjugué. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence de l'anticorps de prothrombine est établie par spectrophotométrie en mesurant l'intensité de la couleur se développant dans les puits de patient et en la comparant avec celle d'une courbe d'étalonnage à cinq points.

Réactifs

708835

1. Plaque de microtitration ELISA revêtue d'un antigène purifié, PS/PT (8 puits de 12-1) avec support dans un sachet film contenant des dessicatifs
2. ELISA Negative Control, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et du sérum humain ne contenant aucun anticorps humain IgG anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
3. aPS/PT IgG ELISA Control, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgG anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
4. aPS/PT IgG ELISA Calibrator A, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgG anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
5. aPS/PT IgG ELISA Calibrator B, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgG anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
6. aPS/PT IgG ELISA Calibrator C, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgG anti-S/PT prédiué, 1,2 ml
7. aPS/PT IgG ELISA Calibrator D, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgG anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
8. aPS/PT IgG ELISA Calibrator E, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgG anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
9. HRP aPS/PT IgG Conjugate (chèvre), 1 flacon, coloration bleu contenant un tampon, des stabilisateurs de protéine et un conservateur, 10 ml
10. HRP Sample Diluent Plus, 1 flacon, coloration rose, contenant une solution saline à base de tampon tris, du Tween 20, calcium, des stabilisateurs de protéine et un conservateur, 50 ml
11. HRP Wash Buffer Plus (40x), 1 flacon de concentré 40x, coloration rouge contenant une solution saline à base de tampon tris, du Tween 20 et du calcium, 25 ml. Voir le chapitre sur les méthodes pour les instructions relatives à la dilution
12. TMB Chromogen, 1 flacon contenant des stabilisateurs, 10 ml
13. HRP Stop Solution, 0,344 M d'acide sulfurique, 1 flacon, incolore.

OU

708845

1. Plaque de microtitration ELISA revêtue d'un antigène purifié, PS/PT (8 puits de 12-1) avec support dans un sachet film contenant des dessicatifs
2. ELISA Negative Control, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et du sérum humain ne contenant aucun anticorps humain IgM anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
3. aPS/PT IgM ELISA Control, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgM anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
4. aPS/PT IgM ELISA Calibrator A, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgM anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
5. aPS/PT IgM ELISA Calibrator B, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgM anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
6. aPS/PT IgM ELISA Calibrator C, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgM anti-S/PT prédiué, 1,2 ml
7. aPS/PT IgM ELISA Calibrator D, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgM anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
8. aPS/PT IgM ELISA Calibrator E, 1 flacon de tampon contenant un conservateur et des anticorps sériques humains IgM anti-PS/PT prédiué, 1,2 ml
9. HRP aPS/PT IgM Conjugate (chèvre), 1 flacon, coloration bleu contenant un tampon, des stabilisateurs de protéine et un conservateur, 10 ml
10. HRP Sample Diluent Plus, 1 flacon, coloration rose, contenant une solution saline à base de tampon tris, du Tween 20, calcium, des stabilisateurs de protéine et un conservateur, 50 ml
11. HRP Wash Buffer Plus (40x), 1 flacon de concentré 40x, coloration rouge contenant une solution saline à base de tampon tris, du Tween 20 et du calcium, 25 ml. Voir le chapitre sur les méthodes pour les instructions relatives à la dilution
12. TMB Chromogen, 1 flacon contenant des stabilisateurs, 10 ml
13. HRP Stop Solution, 0,344 M d'acide sulfurique, 1 flacon, incolore.

Avertissements

1. AVERTISSEMENT : Ce produit contient un composant chimique (chloramphénicol à 0,02 %) dans le diluant pour échantillon, les contrôles, les étalons et le conjugué connu dans l'État de Californie pour provoquer des cancers.
2. Toutes les substances d'origine humaine utilisées pour préparer les contrôles de ce produit ont été testées et se sont avérées négatives aux anticorps anti-VIH, HBsAg et VHC par des méthodes approuvées par la FDA. Aucune méthode de test ne peut toutefois garantir que le VIH, le VHB et le VHC ou d'autres agents infectieux sont absents. Par conséquent, le contrôle ELISA anti-aPS/PT, les étalons ELISA anti-aPS/PT et le contrôle négatif ELISA doivent être manipulés de la même façon que tout matériel potentiellement infectieux.²⁹
3. L'azide de sodium sert de conservateur. Il s'agit d'un poison qui peut être toxique en cas d'ingestion ou d'absorption par la peau ou les yeux. Cette substance peut réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre pour former des azides de métal potentiellement explosifs. Rincer les éviers (s'ils sont utilisés pour éliminer le réactif) avec de grands volumes d'eau pour éviter l'accumulation d'azides.
4. Le conjugué HRP contient un produit chimique nocif/corrosif dilué pouvant être toxique en cas d'ingestion en grandes quantités. Pour éviter toute brûlure potentielle par produit chimique, éviter le contact avec la peau et les yeux.
5. Le chromogène TMB contient un irritant pouvant être nocif en cas d'inhalation, d'ingestion ou d'absorption par la peau. Pour prévenir toute blessure, éviter de l'inhaler, de l'ingérer ou de le mettre en contact avec la peau et les yeux.

6. La solution d'arrêt HRP se compose d'une solution d'acide sulfurique diluée. Éviter toute exposition aux bases, aux métaux ou aux autres composants pouvant réagir avec les acides. L'acide sulfurique est un poison corrosif pouvant être toxique en cas d'ingestion. Pour éviter toute brûlure par produit chimique, éviter le contact avec la peau et les yeux.
7. Utiliser un équipement de protection personnelle approprié pour travailler avec les réactifs fournis.
8. Nettoyer immédiatement tout déversement de réactifs. Respecter toutes les législations nationales et locales relatives à l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce produit est à usage diagnostique *in vitro*.
2. La substitution par des composants autres que ceux fournis dans ce système peut entraîner une incohérence des résultats.
3. Un lavage incomplet ou inefficace et un retrait insuffisant de liquide des bandelettes de microtitration ELISA diminuent la précision et/ou augmentent le bruit de fond.
4. L'adaptation de ce test pour une utilisation en tout ou partie avec des passeurs d'échantillons automatiques et d'autres dispositifs de manipulation de liquides peut générer des différences dans les résultats des tests par rapport à ceux obtenus en utilisant la procédure manuelle. Il appartient à chaque laboratoire de vérifier que les résultats de tests produits par sa procédure automatisée se situent dans des limites acceptables.
5. Divers facteurs influent sur les performances du test, notamment la température de départ des réactifs, la température ambiante, la précision et la reproductibilité de la technique de pipetage, le soin apporté au lavage et au retrait de liquide des bandelettes de microtitration ELISA, le photomètre utilisé pour mesurer les résultats et les durées d'incubation pendant le test. Prêter une attention particulière à la cohérence pour obtenir des résultats précis et reproductibles.
6. Il est recommandé de respecter strictement le protocole.
7. Si le sachet zippé contenant les bandelettes de microtitration et les dessicatifs n'est pas refermé hermétiquement, l'antigène se dégrade, de même que la précision.
8. Des taux d'absorbance trop faibles peuvent être observés après deux utilisations ou plus d'un même flacon de conjugué HRP sur une période donnée. Il est important de respecter toutes les procédures de manipulation recommandées du conjugué HRP pour éviter que cela ne se produise.
9. La contamination par produit chimique du conjugué HRP peut être due à un nettoyage ou un rinçage inadapté de l'équipement ou des instruments. Les résidus de produits chimiques courants en laboratoire, tels que le formol, l'eau de Javel, l'éthanol ou un détergent dégradent le conjugué HRP au fil du temps. Rincer abondamment tout l'équipement ou les instruments après usage de produits nettoyant/désinfectant chimiques.

Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du kit entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions.
2. Les bandelettes de microtitration revêtues d'antigène inutilisées doivent être bien refermées dans le sachet film contenant les dessicatifs et conservées entre 2 et 8 °C.
3. Le tampon de lavage dilué est stable pendant 1 semaine entre 2 et 8 °C.

Prélèvement des échantillons

Cette procédure doit être réalisée dans un échantillon de sérum ou de plasma. L'ajout d'azide ou de conservateurs aux échantillons de test peut fausser les résultats. Les échantillons ayant subi une contamination microbienne et thermotraités ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Le sérum ou les échantillons lipémiques ou hémolysés grossièrement doivent être évités. Le document H18-A3 du CLSI (NCCLS) recommande de conserver les échantillons dans les conditions suivantes : 1) Conserver les échantillons à température ambiante pendant 8 heures maximum. 2) Si l'essai n'est pas complété dans les 8 heures, réfrigérez l'échantillon à une température entre 2 et 8°C. 3) Si l'essai n'est pas complété dans les 48 heures, ou pour expédier l'échantillon, congeler à -20°C ou moins. Les échantillons congelés doivent être bien mélangés après décongélation et avant le test.

Procédure

Matériels fournis

708835

- 1 aPS/PT IgG ELISA Plate, (8 puits de 12-1) avec support
- 1 1.2mL prédilué ELISA Negative Control
- 1 1.2mL prédilué aPS/PT IgG ELISA Control
- 1 1.2mL prédilué aPS/PT IgG ELISA Calibrator A
- 1 1.2mL prédilué aPS/PT IgG ELISA Calibrator B
- 1 1.2mL prédilué aPS/PT IgG ELISA Calibrator C
- 1 1.2mL prédilué aPS/PT IgG ELISA Calibrator D
- 1 1.2mL prédilué aPS/PT IgG ELISA Calibrator E
- 1 10mL HRP aPS/PT IgG Conjugate, (chèvre), IgM anti-humains
- 1 50mL HRP Sample Diluent Plus
- 1 25mL HRP Wash Buffer Plus (40x)
- 1 10mL TMB Chromogen
- 1 10mL HRP Stop Solution, 0,344 M d'acide sulfurique

OU

708845

- 1 aPS/PT IgM ELISA Plate, (8 puits de 12-1) avec support
- 1 1.2mL prédilués ELISA Negative Control
- 1 1.2mL prédilués aPS/PT IgM ELISA Control
- 1 1.2mL prédilués aPS/PT IgM ELISA Calibrator A
- 1 1.2mL prédilués aPS/PT IgM ELISA Calibrator B
- 1 1.2mL prédilués aPS/PT IgM ELISA Calibrator C
- 1 1.2mL prédilués aPS/PT IgM ELISA Calibrator D
- 1 1.2mL prédilués aPS/PT IgM ELISA Calibrator E
- 1 10mL HRP aPS/PT IgM Conjugate, (goat), anti-human IgM
- 1 50mL HRP Sample Diluent Plus
- 1 25mL HRP Wash Buffer Plus (40x)
- 1 10mL TMB Chromogen
- 1 10mL HRP Stop Solution, 0,344 M d'acide sulfurique

Matériels supplémentaires requis mais non fournis

Micropipettes permettant d'administrer 5, 100, 200-300 et 500 µL

Embouts de micropipettes à usage unique

Tubes de test pour dilutions d'échantillons patients, volume de 4 ml

Eau distillée ou désionisée

Conteneur de 1 L pour le tampon de lavage HRP dilué

Lecteur de plaques de microtitration capable de mesurer une DO à 450 nm (et 620 nm pour des mesures à double longueur d'onde)

Méthode

Avant de commencer

1. Ramener tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20-26 °C) et bien mélanger.
2. Diluer le tampon de lavage HRP Plus selon un rapport 1:40 en ajoutant le contenu du flacon de Le tampon de lavage HRP Plus à 975 ml d'eau distillée ou désionisée. Si une partie de la plaque n'est pas utilisée pendant cette période, une plus petite quantité peut être préparée en ajoutant 2,0 ml de concentré à 78 ml d'eau distillée ou désionisée pour 16 puits. Le tampon dilué est stable pendant 1 semaine entre 2 et 8 °C.
3. Préparer une dilution 1:101 de chaque échantillon patient en ajoutant 5 µL d'échantillon à 500 µL de diluant pour échantillon HRP Plus. Les échantillons dilués doivent être utilisés dans les 8 heures suivant la préparation. **NE PAS DILUER** les étalons d'IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT, le contrôle ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT et le contrôle négatif ELISA.
4. La détermination de la présence ou de l'absence d'anti-phosphatidylsérine/prothrombine nécessite deux puits pour chacun des étalons et des contrôles et un ou deux puits pour chaque échantillon de patient. Il est recommandé d'exécuter les échantillons en double.
5. Préparation d'une courbe standard : pour les points A à E de la courbe standard à 5 points, utiliser les étalons **PRÉDILUÉS** de A à E pour dosage ELISA des IgG ou IgM anti-aPS/PT directement du flacon. La courbe standard à cinq points a la valeur suivante :

Point	IgG ou IgM anti-aPS/PT unités
A aPS/PT IgG ou IgM ELISA Calibrator A prédilués	150,0
B aPS/PT IgG ou IgM ELISA Calibrator B prédilués	75,0
C aPS/PT IgG ou IgM ELISA Calibrator C prédilués	37,5
D aPS/PT IgG ou IgM ELISA Calibrator D prédilués	18,75
E aPS/PT IgG ou IgM ELISA Calibrator E prédilués	9,375 ou 9,4

Procédure de test

1. **TOUS LES RÉACTIFS DOIVENT ÊTRE RAMENÉS À TEMPÉRATURE AMBIANTE (20-26 °C) AVANT DE COMMENCER LE TEST.** Placer le nombre requis de puits/bandelettes de microtitration dans le support. **Replacer immédiatement les bandelettes inutilisées dans le sachet contenant les dessicatifs et le refermer hermétiquement pour limiter l'exposition à la vapeur d'eau.**
2. Verser 100 µL de chacun des cinq étalons, des échantillons de patient dilués, du contrôle négatif ELISA et du contrôle pour dosage ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT dans les puits. **REMARQUE : les étalons du dosage ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT, le contrôle des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT et le contrôle négatif pour dosage ELISA sont prédilués et prêts à l'emploi.** Couvrir les puits et incuber pendant 30 minutes à température ambiante sur une surface plane. Le temps d'incubation commence après ajout du dernier échantillon.
3. Étape de lavage : Aspirer complètement le contenu de chaque puits. Ajouter 200 à 300 µL du tampon de lavage HRP Plus dilué dans tous les puits, puis aspirer. Répéter cette séquence deux fois de plus pour obtenir un total de trois lavages. Retourner la plaque et la tapoter sur un support absorbant pour retirer tout fluide résiduel après le dernier lavage. Il est important de vider complètement chaque puits après chaque étape de lavage. Conserver la même séquence pour l'aspiration que celle utilisée pour ajouter l'échantillon.
4. Ajouter 100 µL d'IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT conjugué à HRP dans chaque puits. Le conjugué doit être retiré des flacons dans des conditions aseptiques standards et selon les bonnes pratiques de laboratoire. Retirer du flacon uniquement la quantité de conjugué nécessaire pour le test. **POUR ÉVITER TOUTE CONTAMINATION MICROBIENNE ET/OU CHIMIQUE POTENTIELLE, NE JAMAIS REPLACER UN CONJUGUÉ INUTILISÉ DANS LE FLACON.** Incuber les puits pendant 30 minutes, comme à l'étape 2.
5. Étape de lavage : répéter l'étape 3.
6. Ajouter 100 µL de chromogène TMB à chaque puits et incuber **dans le noir** pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt HRP à chaque puits. Maintenir la même séquence et la même heure d'ajout de solution d'arrêt HRP que celles utilisées pour le chromogène TMB. Tapoter doucement la plaque avec un doigt pour bien mélanger les puits.
8. Lire l'absorbance (DO) de chaque puits à 450 nm dans l'heure suivant l'arrêt de la réaction. Si des mesures bi-chromatiques sont nécessaires, 620 nm peuvent servir de longueur d'onde de référence.

Contrôle de qualité

1. Les étalons pour dosage ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT, le contrôle ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT et le contrôle négatif pour dosage ELISA doivent être ajoutés à chaque lot d'échantillons pour garantir que tous les réactifs et toutes les procédures sont exécutés comme il convient.
2. Notez que, puisque les étalons pour dosage ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT, le contrôle ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT et les contrôles négatifs pour dosage ELISA sont prédilués, ils ne contrôlent pas les méthodes procédurales associées à la dilution des spécimens.
3. D'autres contrôles peuvent être testés conformément aux directives ou exigences des législations locales et/ou nationales et des organismes d'accréditation. D'autres sérums de contrôle adaptés peuvent être préparés en aliquotant des échantillons de sérum humain poolés et en les conservant à <-20 °C.
4. Pour que les résultats de test soient considérés comme valides, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être remplis. Si l'un d'eux ne l'est pas, le test doit être considéré comme non valide et il devra être répété.
 - a. L'absorbance de l'étoile A de dosage ELISA des IgG ou IgM anti-aPS/PT prédilués doit être supérieure à l'absorbance du contrôle ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT prédilués qui doit être elle-même supérieure à celle du contrôle négatif ELISA prédilué.
 - b. L'étoile A de dosage ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT prédilués doit avoir une absorbance supérieure à 1,0 tandis que l'absorbance du contrôle négatif ELISA prédilué ne peut pas dépasser 0,2.
 - c. L'absorbance du contrôle ELISA des IgG anti-aPS/PT ou IgM anti-aPS/PT doit être plus de deux fois celle du contrôle négatif ELISA ou plus de 0,25.
 - d. La concentration du contrôle ELISA doit être dans la fourchette établie sur l'étiquette.
 - e. L'utilisateur doit se reporter au document C24-A3 du CLSI (NCCLS) pour obtenir davantage de directives sur les pratiques de contrôle qualité appropriées.

Calcul des résultats

1. Déterminer la valeur moyenne pour tous les relevés dupliqués.
2. Représenter graphiquement la courbe de l'étaillon pour l'essai aux IgG ou IgM par référence au registre de leurs concentrations. Utilisez un tracé de courbe de meilleure adaptation. Un tracé log/log peut aussi être utilisé. Les unités PS/PT assignées aux étalons se trouvent sur le flacon de l'étaillon concerné.
3. Déterminer la concentration inconnue d'IgG ou IgM anti-PS/PT dans les unités IgG ou IgM anti-PS/PT à partir de l'axe « X » en relevant l'absorbance correspondante sur l'axe « Y ».
4. Les valeurs négatives vont de 0 à 30 unités. Les résultats positifs sont supérieurs à 30 unités.

Interprétation des résultats

Le test ELISA est très sensible à la technique et peut détecter d'infimes différences au sein d'un groupe de patients. Les valeurs illustrées ci-dessous sont à titre indicatif uniquement. Chaque laboratoire doit établir sa propre plage normale selon ses techniques, ses contrôles, son équipement et son groupe de patient, mais aussi en fonction des procédures qu'il a établies. L'échantillon peut ensuite être classé comme négatif ou positif, selon le tableau ci-dessous.

	Unités
Négatif	≤ 30
Positif	> 30

1. Un résultat positif indique la présence d'IgG ou IgM anti-PS/PT et il suggère la possibilité de certains troubles thrombotiques de certaines maladies auto-immunes telles que le syndrome des antiphospholipides ou d'autres désordres associés à la maladie lupique ou autres troubles thrombotiques du type lupus.
2. Un résultat négatif indique l'absence d'IgG ou IgM anti-PS/PT ou des niveaux inférieurs à la limite de détection de l'essai.
3. Il est suggéré que les résultats rapportés par le laboratoire doivent inclure : « Les résultats suivants ont été obtenus avec l'Inova QUANTA Lite aPS/PT IgG ou l'QUANTA Lite aPS/PT IgM ELISA. Les valeurs pour les IgG ou IgM anti-PS/PT obtenues avec des méthodes d'essais de fabricants différents ne peuvent pas être utilisées de façon interchangeable.

Limites du test

1. L'intérêt clinique des IgG ou IgM anti-PS/PT dans les maladies autres que la maladie lupique ou l'APS est actuellement sous étude.
2. Lorsque des titrages d'IgG ou IgM anti-PS/PT négatifs sont relevés en présence d'indications cliniques, un test d'anticoagulant circulant, d'anticardiolipine, d'anti-β₂ ou autre essai supplémentaire est indiqué.
3. Un diagnostic ne peut pas être émis sur la seule base des résultats aux IgG ou IgM anti-PS/PT. Ces résultats doivent être interprétés en conjonction avec d'autres découvertes physiques.
4. Le traitement ne doit pas être entamé sur la seule base d'un tirage positif en IgG ou IgM anti-PS/PT. D'autres indications cliniques doivent également venir en support au traitement.
5. Il est prévu que certains échantillons puissent être positifs à l'anticardiolipine et/ou positif à l'anti-GPI β₂, mais négatif pour les IgG ou IgM anti-PS/PT. Le test pour l'anti-GPI β₂ est un marqueur spécifique de risque thrombotique. Le test à l'anticardiolipine peut produire de faux positifs en raison de la réactivité croisée avec le dsDNA ou les anticorps de certaines maladies infectieuses. De même, les patients avec APS peuvent être positifs pour la PS/PT tout en étant négatif pour l'anticoagulant circulant, l'anticardiolipine ou l'anti-β₂.
6. Les caractéristiques de performances du test n'ont pas été établies pour d'autres matrices que le sérum ou le plasma.
7. Ces essais sont pour usage *In Vitro*.

Caractéristiques spécifiques des performances et études cliniques

Synthèse des études cliniques

Les performances des kits QUANTA Lite aPS/PT IgG et QUANTA Lite aPS/PT IgM ont été évaluées dans une étude interne et une autre externe. Le tableau ci-dessous présente les résultats combinés :

Groupe de patient	Nb d'échantillons	Nombre positif (%)		
		IgG anti-PS/PT	IgM anti-PS/PT	IgG et/ou IgM
Normaux	247	3 (1,2%)	4 (1,6%)	7 (2,8%)
Anticoagulant circulant				
Positif (LAC)	24	21 (87,5%)	19 (79,2%)	24 (100%)
Syndrome anti-phospholipide (APS)	71	33 (46,5%)	34 (47,9%)	48 (67,6%)
Polyarthrite rhumatoïde	6	0	0	0
Maladie de Crohn	2	0	0	0
Rectocolite ulcéro-hémorragique	2	0	0	0
Maladie coeliaque	5	0	0	0
Négatif (LAC)	8	0	1 (12,5%)	1 (12,5%)
Nombre positif (%)				
Maladie infectieuse				
(CMV, Toxo, rubéole, VHS, VHB, VHC)	14	0	0	0
Syphilis	12	0	0	0
Positive à l'anti-actine	1	0	0	0
H. pylori	2	0	0	0

L'usage combiné des IgG et IgM anti-PS/PT a détecté tous les positifs connus d'anticoagulant circulant et 67,6 % des patients avec APS. Seuls 3 parmi les 247 spécimens normaux ont répondu positivement sur la trousse IgG pour une spécificité de 99 % (3/299) et aucun des 52 autres contrôles pathologiques ne l'a fait. Seuls 4 parmi les 247 spécimens normaux ont répondu positivement sur la trousse IgM pour une spécificité de 98,3% (5/299) et aucun des 52 autres sérums de contrôle ne l'a fait.

Concordance clinique avec GPI β_2

Les trousse QUANTA Lite aPS/PT IgG et QUANTA Lite aPS/PT IgM ont été comparées avec 510(k) essais homologués pour la détection des IgG et IgM anti-GPI β_2 . Les échantillons testés inclus 71 patients avec APS, 24 positifs pour l'anticoagulant circulant et 85 normaux pour un total de 180 échantillons. Les résultats sont résumés ci-dessous.

		IgG anti-aPS/PT	
		+	-
IgG	+	38	10**
GPI β_2	-	16*	116

* L'un des 16 était positif pour le LAC et les 15 autres étaient des patients APS.

** Les dix étaient du groupe APS.

		IgM anti-aPS/PT	
		+	-
IgM	+	28	7*
GPI β_2	-	25**	120

* L'un d'eux était un normal et 6 étaient issus du groupe APS.

** Vingt deux étaient du groupe APS et 2 positifs pour LAC.

L'accord global pour les trousse IgG et IgM anti-PS/PT relativement aux trousse GPI β_2 est de 85,6 % et 82,2 %. La plupart des résultats discordants sont dus à la sensibilité plus élevée des trousse pour IgG et IgM anti-PS/PT pour les positifs LAC et en particulier pour les patients APS, bien que certains de ces derniers patients positifs pour GPI β_2 étaient négatifs pour la PS/PT. Les trousse IgG Plus anti-PS/PT ont détecté tous les échantillons positifs pour LAC et la plupart des patients APS. Il a été relevé que la vaste majorité des patients APS étaient positifs pour PS/PT et/ou GPI β_2 .

Comparaison des méthodes

Les trousse d'IgG et IgM anti-aPS/PT ont été comparés aux trousse d'IgG anti-GPI β_2 et IgM anti-GPI β_2 en utilisant un total de 62 échantillons pour la comparaison des IgG et 63 échantillons pour la comparaison des IgM. Les échantillons sélectionnés ont tous produits des valeurs dans la fourchette linéaire d'essai. Les résultats sont présentés ci-dessous avec les calculs d'accord positif, négatif et relatif.

Dosage ELISA IgG anti-aPS/PT				
		Positif	Négatif	Total
ELISA IgG anti-GPI β_2	Positif	13	7	20
	Négatif	6	36	42
	Total	19	43	62
Accord positif en pourcentage		65%		
Accord négatif en pourcentage		83,7%		
Accord relatif		77,8%		

Dosage ELISA IgM anti-aPS/PT				
		Positif	Négatif	Total
ELISA IgG anti-GPI β_2	Positif	13	3	16
	Négatif	11	36	47
	Total	24	39	63
Accord positif en pourcentage		81,3%		
Accord négatif en pourcentage		76,6%		
Accord relatif		77,8%		

Précision et reproductibilité

Huit échantillons ont été testés dans six expériences effectuées en parallèle sur le dosage ELISA des IgG anti-aPS/PT sur six journées différentes. Total n= 36. Les résultats de valeur unitaire sont résumés ci-dessous.

Valeur des unités IgG	1,4	139,3	79,3	36,8	22,2	8,3	53,8	1,7
Sdev intra-essai	0,1	6,8	4,9	2,5	1,7	0,8	3,4	0,1
%CV	8,1	4,9	6,2	6,7	7,8	9,9	6,4	7,1
Sdev intra-essai	0,2	4,2	3,3	1,6	1,2	0,4	2,3	0,1
%CV	12,0	3,0	4,2	4,5	5,3	5,2	4,2	8,3

Huit autres échantillons ont été testés dans six expériences effectuées en parallèle sur le dosage ELISA IgM anti-aPS/PT sur six journées différentes. Total n= 36. Les résultats de valeur unitaire sont résumés ci-dessous.

Valeur des unités IgM	3,1	153,2	75,8	36,0	18,2	9,8	58,2	3,2
Sdev intra-essai	0,2	5,9	3,3	1,7	0,7	0,6	2,6	0,2
%CV	5,8	3,8	4,4	4,6	3,8	6,3	4,5	6,4
Sdev intra-essai	0,3	4,3	2,4	1,1	0,5	0,4	2,1	0,2
%CV	9,9	2,8	3,2	3,0	2,6	3,8	3,6	7,4

Fourchette linéaire

IgG anti-aPS/PT : 5,1-150 unités

IgM anti-aPS/PT : 3,6-150 unités

Pour les échantillons avec des valeurs de plus de 150 unités, rapportez le résultat comme > 150 unités ou positif. Pour les échantillons avec des valeurs inférieures à 5,1 unités pour IgG ou 3,6 unités pour IgM, rapportez le résultat comme < 5,1 ou < 3,6 ou négatif.

Symboles utilisés

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Conformité aux normes européennes
	Représentant européen agréé
	Sur ordonnance uniquement, conformément aux dispositions de la FDA.
	Limite de température
	Code du lot
	Numéro de catalogue ou référence
	Fabricant
	Date de péremption
	Contenu suffisant pour <n> Tests
	Consulter les instructions d'utilisation.

Références

1. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 342:341-4, 1993.
2. Roubey R. Autoantibodies to Phospholipid-Binding Plasma Proteins: A New View of Lupus Anticoagulant and Other "Antiphospholipid" Antibodies. *Blood* 84:2854-67, 1994.
3. McNeil HP, et al. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4120-4, 1990.
4. Galli M, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 335:1544-7, 1990.
5. Matsuura E, et al. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease.
6. Matsuura E, et al. Anticardiolipin antibodies recognize β 2-Glycoprotein I structure altered by interacting with oxygen modified solid phase surface. *J Exp. Med.* 179:457-62, 1994.
7. Roubey RA, et al. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to β 2 Glycoprotein I and a conventional anticardiolipin immunoassay. *Arthritis Rheum* 39:1606-7, 1996.
8. McNally T, et al. Increased levels of β 2 Glycoprotein I antigen and β 2 Glycoprotein I binding antibodies are associated with a history of thromboembolic complications in patients with SLE and primary antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 34:1031-6, 1995.
9. Teixido M, et al. Anti β 2 Glycoprotein I antibodies: a useful marker for the antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 36:113-6, 1997.
10. Amengual O, et al. Specificity of *ELISA* for antibody to β 2 Glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 35:1239-43, 1996.
11. Lewis S, et al. Standardized measurement of major immunoglobulin class (IgG, IgA and IgM) antibodies to β 2 Glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *J Clin Lab Analysis* 12:293-97, 1998.
12. Mann KG, et al. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 76:1-16, 1990.
13. Galli M, et al. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and β 2 glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 86:617-23, 1995.
14. Bevers EM, et al. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 66:629-32, 1991.
15. Perpimkul P, et al. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and β 2 Glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 83:2878-92, 1994.
16. Arvieux J, et al. Development of an *ELISA* for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with Lupus Anticoagulant. *Thromb Haemost* 74:1120-5, 1995.
17. Galli M. Non β 2-glycoprotein I cofactors for antiphospholipid antibodies. *Lupus* 5:388-92, 1996.
18. Petri M, et al. Anti-plasma protein antibodies are predictive of thrombotic events (TE). *Arthritis Rheum* 37:S 281, 1994.
19. Horbach D, et al. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 76:916-24, 1996.
20. Vaarala O, et al. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost* 75:456-9, 1996.
21. Fleck RA, et al. Anti-prothrombin antibodies and the Lupus Anticoagulant. *Blood* 72:512-9, 1998.
22. Oosting JD, et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with Prothrombin, Protein C, or Protein S: an explanation for their pathogenic mechanism?. *Blood* 81:2618-25, 1993.
23. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 75:536-41, 1996.
24. Bertolaccini M, et al. Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 25:1104-08, 1998.
25. Amengual O, et al. Specificities, properties and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum* 48:886-95, 2003.
26. D'Agnillo P, et al. Prothrombin binds to the surface of apoptotic, but not viable cells and serves as a target of Lupus Anticoagulant antibodies. *J of Immunol* 170:3408-22, 2003.
27. Atsumi T, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 43:1982-93,2000.
28. Atsumi T. Antiprothrombin antibodies – are they worth assaying? *Thrombosis Research* 114: 533-38,2004.
29. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

QUANTA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2019 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

Fabricant:

Inova Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 00+ 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Australian Sponsor:

Werfen Australia Pty Ltd
59-61 Dickson Avenue
Artarmon NSW 2064 Australia
Tel. +61 2 9098 0200 / 1300 369 132
<http://au.werfen.com/>

Représentant Autorisé:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

628835FR

Septembre 2019
Révision 6

