

EN



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anti-Mitochondrial M2 Antibody (AMA) ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1163 Anti-Mitochondrial (M2) Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-mitochondrial antibodies (AMA) in human serum. The presence of AMA can be used as an adjunct to clinical and other laboratory findings in the diagnosis of primary biliary cirrhosis.

SUMMARY AND EXPLANATION

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a disease of the liver characterized by inflammatory obliteration of the intrahepatic bile ducts^{1,2}. PBC is characterized by the presence of anti-mitochondrial antibodies (AMA). AMA detected by indirect immunofluorescence (IF) occur in approximately 90% of patients with PBC and in 3-10% of patients with autoimmune hepatitis as well as in certain other disorders such as syphilis and drug induced hepatitis³. As many as nine different staining reactions have been described by indirect IF, but only one, the M2 reaction is specific for PBC⁴. Inability to easily distinguish different AMA reactions compromises the utility of indirect IF test methods for diagnosing PBC.

Biochemical and immunochemical studies have identified PBC specific mitochondrial antigen to be localized on the inner mitochondrial membrane and is identified to be the mitochondrial enzyme pyruvate dehydrogenase (PDH). Subsequent studies identified PBC antigen to be 70 kD molecular weight. The mitochondrial antigen associated with PBC is the E2 subunit of a functionally related enzyme family of 2-oxo-acid dehydrogenase complex (2-OADC)⁵⁻⁷.

The Immco™ anti-mitochondrial M2 antibody ELISA is a specific and sensitive immunoassay for the detection of AMA associated with PBC.

PRINCIPLES OF PROCEDURES

The test is performed as a solid phase enzyme labeled immunosorbent assay (ELISA) in microwells coated with purified mitochondrial antigen. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the microwells allowing anti-mitochondrial antibodies present in the serum to bind the antigen. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are incubated with an enzyme labeled anti-human IgG conjugate. Unbound conjugate is removed by washing the microwells. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of the substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in Enzyme Units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20°-25°C) prior to use.

When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered

EN

potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials⁸.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

Materials provided

ImmULisa™ Mitochondrial (M2) Antibody ELISA **REF** 1163

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	MICROPLATE M2	Microplate with individual breakaway microwells coated with mitochondrial antigen
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A M2 *	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>). Human serum containing mitochondrial antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B M2 *	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>). Human serum containing mitochondrial antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C M2 *	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>). Human serum containing mitochondrial antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D M2 *	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>). Human serum containing mitochondrial antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL + M2 *	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for mitochondrial antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>whitecap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.







* Contains <0.1% NaN₃

Symbols used on labels:

LOT Lot number

REF Catalog number

EN

-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer or Automatic Microplate washer capable of dispensing 200 µl
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

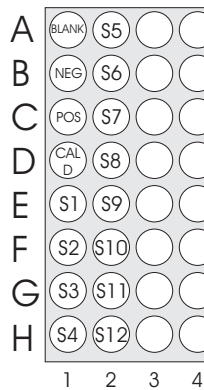
- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

EN

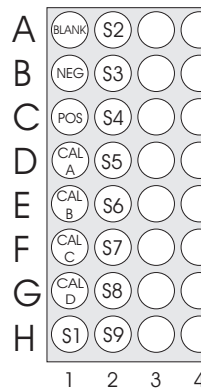
Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*).
or For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.

QUALITATIVE DETERMINATION



SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder .
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

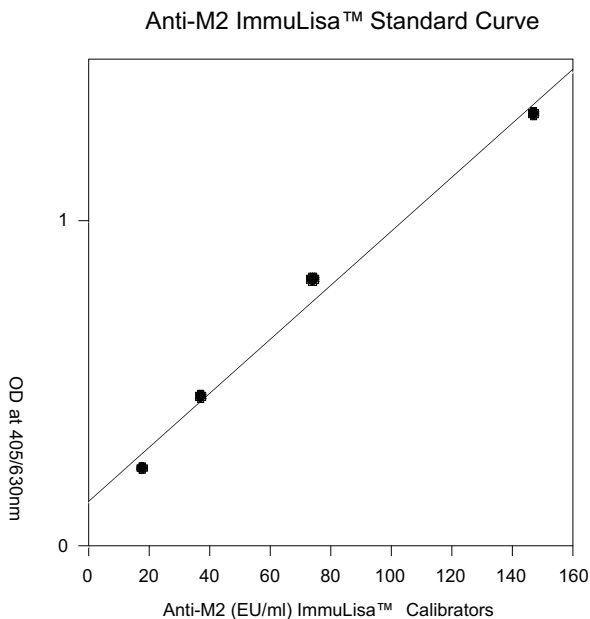
The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.



Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

EN

Interpretation

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values. These may vary with the population examined.

AMA value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The results obtained serve only as an aid in the diagnosis of PBC and should not be interpreted as diagnostic in themselves. Serum of some PBC patients may be negative for AMA.

EXPECTED VALUES

Incidence of AMA by ELISA

Disease	Incidence %
Primary Biliary Cirrhosis	95-100
Autoimmune Hepatitis	0
Systemic Lupus Erythematosus	0
Rheumatoid Arthritis	0
Systemic Scleroderma	0

Note: The incidence of AMA may vary depending upon the patient population studied and the criteria of selection.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Immulisa™ anti-mitochondrial antibody test was compared with a commercially available indirect immunofluorescence test kit for the detection of anti-mitochondrial antibodies in human serum.

A total of 113 sera were obtained from a clinical reference laboratory. They were identified as positive or negative for AMA by indirect immunofluorescence and were tested according to the procedures recommended by the manufacturer. The results are summarized in the following table:

Comparison of ELISA and IFA for detecting AMA				
		Positive	Negative	Total
Other ELISA	Positive	35	2	37
	Negative	2	74	76
	Total	37	76	113

Agreement: 96.5 %
Sensitivity: 94.6 %
Specificity: 97.4 %

EN

Precision:

Based on 10 replicates, the intra-assay and inter-assay coefficient of variation (CV) were calculated and found to be between 5.4 and 9.5%, depending upon the concentration of the antibody:

	mean value (EU/ml)	inter-assay %CV	intra-assay %CV
Sample 1	146	5 %	7 %
Sample 2	82	10 %	7 %

Recovery:

Samples with known AMA concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts. AMA levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated:

	Ab. conc added (EU/ml)	Ab. conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	106	108	102
Sample 2	88	78	89
Sample 3	53	56	105

EL



IMMCO
DIAGNOSTICS

Μέθοδος ELISA για αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) M2

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1163 Μέθοδος ELISA για αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (M2) 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων σε ορό ανθρώπου. Η παρουσία των AMA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επικουρικό μέσο των κλινικών και άλλων εργαστηριακών ευρημάτων, για τη διάγνωση της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η πρωτοπαθής χολική κίρρωση (ΠΧΚ) είναι μια ηπατική νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη καταστροφή των ενδοηπατικών χοληφόρων^{1,2}. Η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA). Τα AMA που ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό (EA) εμφανίζονται περίπου στο 90% των ασθενών με ΠΧΚ και στο 3-10% των ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα, καθώς και σε ορισμένες άλλες διαταραχές, όπως η σύφιλη και η επαγόμενη από φάρμακα ηπατίτιδα³. Έχουν περιγραφεί έως και εννέα διαφορετικές αντιδράσεις χρώσης με EA, αλλά μόνο μία, η αντίδραση M2, είναι ειδική για την ΠΧΚ⁴. Η αδυναμία εύκολου διαχωρισμού των διαφορετικών αντιδράσεων AMA μειώνει τη χρησιμότητα των έμμεσων μεθόδων ανάλυσης EA για τη διάγνωση της ΠΧΚ.

Βιοχημικές και ανοσοχημικές μελέτες έχουν αναγνωρίσει ότι το ειδικό για την ΠΧΚ μιτοχονδριακό αντιγόνο εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και έχει αναγνωριστεί ως το μιτοχονδριακό ένζυμο πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH). Επόμενες μελέτες αναγνώρισαν ότι το αντιγόνο ΠΧΚ έχει μοριακό βάρος 70 kD. Το μιτοχονδριακό αντιγόνο που σχετίζεται με την ΠΧΚ είναι η υπομονάδα E2 μιας λειτουργικά συγγενούς οικογένειας ενζύμων του συμπλόκου της 2-οξο-όξινης αφυδρογονάσης (2-OADC)⁵⁻⁷.

Η μέθοδος ELISA για αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα M2 Immco™ είναι μια ειδική και ευαίσθητη ανοσολογική μέθοδος για την ανίχνευση των AMA που σχετίζονται με την ΠΧΚ.

ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Η ανάλυση διενεργείται ως ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση (ELISA) στερεάς φάσης, σε μικροκυψελίδες επικαλυμμένες με κεκαθαμένο μιτοχονδριακό αντιγόνο. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις μικροκυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση στο αντιγόνο όλων των αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων του ορού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν επωάζονται με ένα σημασμένο με ένζυμο συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ενζύμου ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.

Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο

EL

μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών⁸.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μολυβδό και χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (M2) ImmuLisa™ **REF** 1163

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	MICROPLATE M2	Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με μιτοχονδριακό αντιγόνο.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A M2 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής A (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντιμιτοχονδριακά αντισώματα.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B M2 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής B (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντιμιτοχονδριακά αντισώματα.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C M2 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντιμιτοχονδριακά αντισώματα.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D M2 *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντιμιτοχονδριακά αντισώματα.
1 x 1,5 ml	CONTROL + M2 *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντιμιτοχονδριακά αντισώματα.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.

EL

1 x 12 ml **SUBSTRATE** *

Έτοιμο προς χρήση **ενζυμικό υπόστρωμα**. Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως.

1 x 12 ml **STOP**

Έτοιμο προς χρήση **διάλυμα τερματισμού**.

2 x **BUF** **WASH**

Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃


Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ή αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπιετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.

EL

- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπύκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

Μέθοδος ανάλυσης

Βήμα 1 Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Βήμα 2 Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.

Βήμα 3 Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)
ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

Βήμα 4 Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.

Βήμα 5 Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.

Βήμα 6 Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.

Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.

EL

- Βήμα 7** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επωάστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστηρίου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστηρίου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστηρίου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

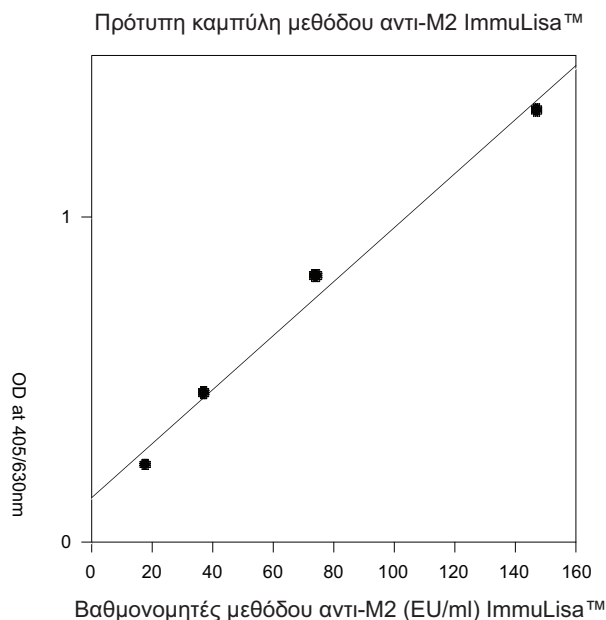
Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του Βαθμονομητή D = EU/ml του εξεταζόμενου δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομητή D

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.



Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσης.

Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές. Οι τιμές αυτές ενδέχεται να ποικίλλουν σε κάθε πληθυσμό που εξετάζεται.

Τιμή AMA	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση της ΠΧΚ και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά. Ο ορός ορισμένων ασθενών με ΠΧΚ ενδέχεται να είναι αρνητικός για τα AMA.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Συχνότητα εμφάνισης των AMA με ELISA

Νόσος	% συχνότητα εμφάνισης
Πρωτοπαθής χολική κίρρωση	95-100
Αυτοάνοση ηπατίτιδα	0
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	0
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	0
Συστηματική σκληροδερμία	0

EL

Σημείωση: Η συχνότητα εμφάνισης των AMA ενδέχεται να ποικίλλει, ανάλογα με τον υπό μελέτη πληθυσμό ασθενών και τα κριτήρια επιλογής.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η ανάλυση αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων ImmuLisa™ συγκρίθηκε με ένα διαθέσιμο στο εμπόριο kit ανάλυσης με έμμεσο ανοσοφθορισμό για την ανίχνευση αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων σε ορό ανθρώπου.

Ένα σύνολο 113 ορών συλλέχθηκε από ένα κλινικό εργαστήριο αναφοράς. Οι οροί αναγνωρίστηκαν ως θετικοί ή αρνητικοί στα AMA με έμμεσο ανοσοφθορισμό και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις προτεινόμενες από τον παρασκευαστή διαδικασίες. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σύγκριση της μεθόδου ELISA και του έμμεσου ανοσοφθορισμού στην ανίχνευση των AMA

		Θετικοί	Αρνητικοί	Σύνολο
Άλλη ELISA	Θετικοί	35	2	37
	Αρνητικοί	2	74	76
	Σύνολο	37	76	113

Συμφωνία: 96,5 %
Ευαισθησία: 94,6 %
Ειδικότητα: 97,4 %

Ακρίβεια:

Με βάση 10 αντίγραφα, οι συντελεστές ποικιλότητας εντός σειράς και μεταξύ σειρών (CV) υπολογίστηκαν και βρέθηκαν να είναι μεταξύ 5,4 και 9,5%, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αντισώματος:

	Μέση τιμή (EU/ml)	Συντ. ποικιλ. μεταξύ σειρών	Συντ. ποικιλ. εντός σειράς
Δείγμα 1	146	5 %	7 %
Δείγμα 2	82	10 %	7 %

Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων AMA αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων AMA. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων AMA των αναμιχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση.

	Συγκεντρ. αντισ. προστιθέμενη (EU/ml)	Συγκεντρ. αντισ. ληφθείσα (EU/ml)	Ανάκτηση %
Δείγμα 1	106	108	102
Δείγμα 2	88	78	89
Δείγμα 3	53	56	105

ES



Ensayo ELISA para anticuerpos antimitocondriales M2 (AMA)

IVD

PRESENTACIÓN

REF 1163 ELISA anticuerpos antimitocondriales (M2) 96 análisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semicuantificación de anticuerpos antimitocondriales (AMA) en suero humano. La presencia de anticuerpos AMA es una herramienta más, junto al examen clínico y otros análisis de laboratorio, en el diagnóstico de cirrosis biliar primaria.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad del hígado en la que se inflaman y destruyen los conductos biliares intrahepáticos^{1,2}. La CBP se caracteriza por la presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA), que se detectan por inmunofluorescencia (IF) en aproximadamente el 90% de pacientes con esta enfermedad y en el 3-10% de pacientes con hepatitis autoinmune, así como en algunas otras patologías tales como sífilis y hepatitis inducida por fármacos³. Se han descrito hasta nueve reacciones diferentes de tinción halladas mediante IF, pero solamente una, la reacción M2, es específica de la CBP⁴. La imposibilidad de distinguir fácilmente las diferentes reacciones AMA compromete la utilidad del método de IF en el diagnóstico de la CBP.

Estudios bioquímicos e inmunoquímicos han localizado el antígeno mitocondrial específico de CBP en la membrana interna del mitocondrio, identificándolo con la enzima mitocondrial piruvato deshidrogenasa (PDH). En estudios posteriores se determinó en 70 kD el peso molecular del antígeno CBP. El antígeno mitocondrial asociado a CBP es la subunidad E2 de una familia de enzimas funcionalmente relacionadas del complejo 2-oxoácido-deshidrogenasa (2-OADC)⁵⁻⁷.

El análisis ELISA para anticuerpos antimitocondriales M2 ImmuLISA™ es un inmunoensayo específico y sensible para detectar AMA asociados a CBP.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) en pocillos recubiertos de antígeno mitocondrial purificado. Controles, calibradores y suero del paciente se incuban en los pocillos permitiendo que los anticuerpos antimitocondriales presentes en el suero se unan al antígeno. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se incuban con un conjugado de IgG anti humana marcado con enzima. Después de eliminar por lavado el conjugado que no se hubiera unido, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). Una vez detenida la reacción enzimática, la intensidad del color cambia de manera proporcional a la concentración de anticuerpos y se lee con espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por mililitro (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y

las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales⁸.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA para anticuerpos antimitocondriales M2 ImmuLisa™ REF 1163

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	MICROPLATE M2	Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno mitocondrial
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A M2 *	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos mitocondriales.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B M2 *	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos antimitocondriales.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C M2 *	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos antimitocondriales.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D M2 *	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos antimitocondriales.
1 x 1.5 ml	CONTROL + M2 *	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano positivo a anticuerpos antimitocondriales.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.







* Contiene <0.1% NaN_3

Símbolos utilizados en las etiquetas:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

ES

-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido o lavador automático de placas con capacidad de 200 μ l
- Pipetas con capacidad de 5 μ l a 1000 μ l
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos. Vuelva a poner los materiales en la nevera inmediatamente después de su uso.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

Procedimiento del ensayo

- Paso 1** Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo.
- Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** **Determinación cualitativa:** use únicamente el Low Calibrator D (*frasco de tapa amarilla*) listo para usar. **Determinación semicuantitativa:** use los calibradores listos para usar de A a D como se muestra en el ejemplo siguiente:

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

- Paso 4** Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de la muestra del paciente con **0.5 ml** de diluyente de suero.
- Paso 5** Coja los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.
- Paso 6** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los correspondientes pocillos, como se indica en la hoja de protocolo.
Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.
- Paso 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de las dos lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

RESULTADOS

Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

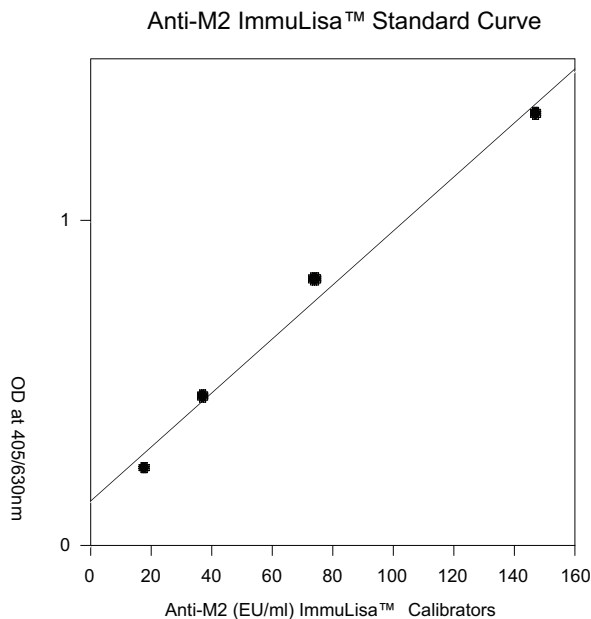
Abs. de muestra analizada

_____ X EU/ml de Calibrador D= EU/ml muestra analizada

Abs. de Calibrador D

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.



Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

ES

Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales, que podrán variar según la población examinada.

Valor AMA	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (Borderline)
>25 EU/ml	Positivo

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados obtenidos son sólo una herramienta más para el diagnóstico de CBP y no deben interpretarse como un diagnóstico por sí solos. El suero de algunos pacientes con CBP puede resultar negativo a AMA.

VALORES ESPERADOS

Incidencia de AMA según el método ELISA

Enfermedad	Incidencia %
Cirrosis biliar primaria	95-100
Hepatitis autoinmune	0
Lupus eritematoso sistémico	0
Artritis reumatoide	0
Esclerodermia sistémica	0

Nota: la incidencia de AMA puede variar según la población estudiada y los criterios de selección.

CARACTERÍSTICAS DE EJECUCIÓN

El ensayo ImmuLisa™ para anticuerpos antimitocondriales se comparó con un ensayo de inmuofluorescencia indirecta disponible en comercio para detección de los mismos anticuerpos en suero humano.

Mediante inmunodifusión se identificaron 113 sueros procedentes de un laboratorio clínico de referencia, indicándolos como positivos o negativos a AMA; a continuación, fueron analizados siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Comparación de ELISA e IFA para detección de AMA				
		Positivo	Negativo	Total
Otro ELISA	Positivo	35	2	37
	Negativo	2	74	76
	Total	37	76	113

Correspondencia: 96.5 %
Sensibilidad: 94.6 %
Especificidad: 97.4 %

ES

Precisión:

Basándose en 10 duplicados, se calculó el coeficiente de variación (CV) intraensayo e interensayo, que resultaron de 5,4 y 9,5% según la concentración del anticuerpo:

	valor medio (EU/ml)	inter ensayo %CV	intra ensayo %CV
Muestra 1	146	5 %	7 %
Muestra 2	82	10 %	7 %

Recuperación:

Muestras con concentraciones conocidas de AMA se mezclaron con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades conocidas. Se determinaron los niveles de AMA de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación:

	Conc. ab. añadida (EU/ml)	Conc. ab. obtenida (EU/ml)	% Recuperación
Muestra 1	106	108	102
Muestra 2	88	78	89
Muestra 3	53	56	105

DE



IMMCO
DIAGNOSTICS

M2-Antikörper-ELISA (AMA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1163 ELISA für mitochondriale Antikörper (M2) 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von antimitochondrialen Antikörpern (AMA) in Humanserum. Das Vorhandensein von AMA kann zusätzlich zu klinischen und anderen Laborbefunden bei der Diagnose von primärer biliärer Zirrhose verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Primäre biliäre Zirrhose (PBC) ist eine Lebererkrankung, die durch eine entzündliche Obliteration der intrahepatischen Gallengänge gekennzeichnet ist^{1,2}. PBC ist durch das Vorhandensein von antimitochondrialen Antikörpern (AMA) gekennzeichnet. Mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) nachgewiesene AMA treten bei etwa 90% von Patienten mit PBC und bei 3-10% von Patienten mit autoimmuner Hepatitis sowie bei einigen anderen Krankheiten, z.B. Syphilis und arzneimittelinduzierter Hepatitis, auf³. Mit indirekter IF wurden bis zu neun verschiedene Farbreaktionen beschrieben, von denen jedoch nur eine, die M2-Reaktion, spezifisch für PBC ist⁴. Die Unfähigkeit, verschiedene AMA-Reaktionen leicht voneinander zu unterscheiden, beeinträchtigt die Nützlichkeit indirekter IF-Testmethoden für die Diagnose von PBC.

Biochemische und immunochemische Studien haben auf der inneren mitochondrialen Membran ein PBC-spezifisches mitochondriales Antigen gefunden und dieses als das mitochondriale Enzym Pyruvatdehydrogenase (PDH) identifiziert. Spätere Studien haben für das PBC-Antigen ein Molekulargewicht von 70 kD festgestellt. Das mit PBC assoziierte mitochondriale Antigen ist die E2-Untereinheit der funktionell miteinander verwandten Enzymfamilie 2-Oxosäure-Dehydrogenase-Komplex (2-OADC)⁵⁻⁷.

Der Immulisa™ ELISA für antimitochondriale M2-Antikörper ist ein spezifischer und sensitiver Immuntest für den Nachweis von mit PBC assoziierten AMA.

TESTPRINZIPIEN

Der Test wird als Festphasen-ELISA in mit gereinigtem mitochondrialem Antigen beschichteten Mikrotiterplattenvertiefungen durchgeführt. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben vom Patienten werden in den Vertiefungen inkubiert; dies ermöglicht die Bindung der im Serum vorhandenen antimitochondrialen Antikörper an das Antigen. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden mit einem enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugat inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Enzym-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

DE

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis⁸.

WARNUNG – Natriumazid (NaN_3) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmLisa™ ELISA für mitochondriale Antikörper (M2) **REF** 1163

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen

12 x 8	MICROPLATE	M2	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit mitochondrialem Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A	M2	* Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit mitochondrialen Antikörpern.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B	M2	* Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit mitochondrialen Antikörpern.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C	M2	* Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit mitochondrialen Antikörpern.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D	M2	* Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit mitochondrialen Antikörpern.
1 x 1,5 ml	CONTROL +	M2	* Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält Humanserum positiv für mitochondriale Antikörper.
1 x 1,5 ml	CONTROL -		* Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ	ALKPHOS	* Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL		* Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE		* Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen .
1 x 12 ml	STOP		Gebrauchsfertige Stopplösung .
2 x	BUF	WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält <0,1% NaN_3


DE

Auf den Etiketten verwendete Symbole:


 Chargennummer

 Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

 In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer oder automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.

PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Verfahren

Hinweise zum Verfahren

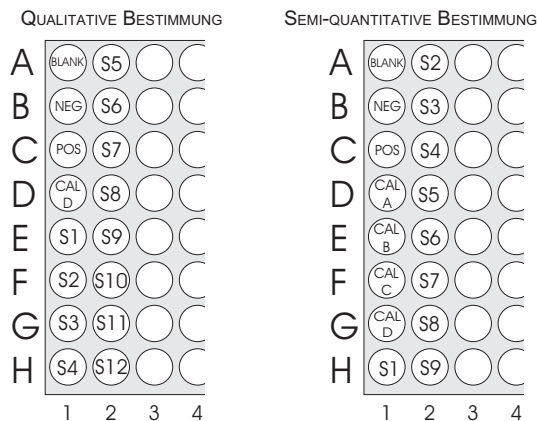
- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.

DE

- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

Testmethode

- Schritt 1** Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.
- Schritt 2** Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
- Schritt 3** Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).
oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.
- Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.
- Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.
- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **viermal** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (\pm 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

DE

Schritt 14 Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.

Schritt 15 Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

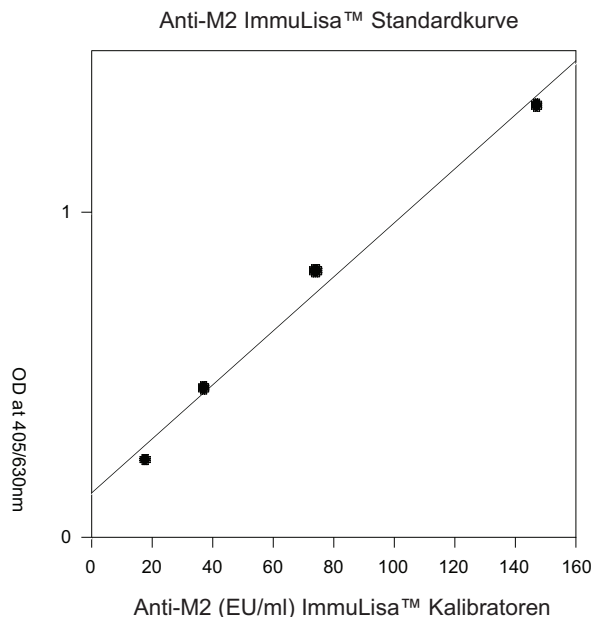
Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{X EU/ml von Kalibrator D} = \text{EU/ml der Testprobe}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



DE

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen. Diese können je nach der untersuchten Patientenpopulation schwanken.

AMA-Wert	Interpretation
<20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
>25 EU/ml	positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose von PBC und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden. Das Serum einiger PBC-Patienten kann AMA-negativ sein.

ERWARTETE WERTE

Häufigkeit von AMA mit ELISA

Krankheit	Häufigkeit %
Primäre biliäre Zirrhose	95-100
Autoimmune Hepatitis	0
Systemischer Lupus Erythematodes	0
Rheumatoide Arthritis	0
Systemische Sklerodermie	0

Anmerkung: Die Häufigkeit von AMA kann je nach der untersuchten Patientenpopulation und den Auswahlkriterien schwanken.

LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmuLisa™ antimitochondriale Antikörpertest wurde mit einem im Handel erhältlichen Kit für einen indirekten Immunfluoreszenztest zum Nachweis antimitochondrialer Antikörper in Humanserum verglichen.

Von einem klinischen Referenzlabor wurden insgesamt 113 Seren bezogen. Diese wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz als positiv oder negativ für AMA identifiziert und gemäß den vom Hersteller empfohlenen Verfahren getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Vergleich von ELISA und IFA für den Nachweis von AMA

		Positiv	Negativ	Gesamt
anderer ELISA	Positiv	35	2	37
	Negativ	2	74	76
	Gesamt	37	76	113

Übereinstimmung: 96,5 %

Sensitivität: 94,6 %

Spezifität: 97,4 %

DE

Genauigkeit:

Die intraseriellen und interseriellen Variationskoeffizienten (VK) wurden auf der Grundlage von 10 Wiederholungen berechnet; sie lagen je nach der Konzentration der Antikörper zwischen 5,4 und 9,5%:

	Mittelwert (EU/ml)	interserieller VK	intraserieller VK
Probe 1	146	5 %	7 %
Probe 2	82	10 %	7 %

Wiederfindung:

Proben mit bekannten AMA-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit bekannten Mengen gemischt. Die AMA-Spiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet.

	AK-Konz. zugefügt (EU/ml)	AK-Konz. gemessen (EU/ml)	% Wiederfindung
Probe 1	106	108	102
Probe 2	88	78	89
Probe 3	53	56	105



Anticorps anti-mitochondries de type 2 (AMA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1163 Test ELISA par anticorps anti-mitochondries 96 Tests

USAGE PRÉVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection et à la semi-quantification des anticorps anti-mitochondries de type 2 (AMA) dans le sérum humain. La présence des anticorps anti-mitochondries peut être utilisée comme support des conclusions cliniques et des autres conclusions de laboratoire dans le cadre du diagnostic de la cirrhose biliaire primaire.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La cirrhose biliaire primaire (PBC) est une maladie du foie, caractérisée par une obstruction inflammatoire des canaux biliaires intrahépatiques^{1,2}. La PBC se caractérise par la présence d'anticorps anti-mitochondries (AMA). Les AMA détectés par immunofluorescence indirecte (IF) se manifestent chez approximativement 90% des patients avec PBC et chez 3-10% des patients présentent une hépatite autoimmune, de même que dans d'autres troubles tels que la syphilis et l'hépatite provoquée par médicaments³. Jusqu'à neuf réactions de coloration différentes ont été décrites en immunofluorescence indirecte (IF) mais une seulement, la réaction M2, est spécifique de la cirrhose biliaire primaire PBC⁴. L'incapacité de distinguer facilement les différentes réactions AMA compromettent l'utilité des méthodes par immunofluorescence indirecte pour le diagnostic de la PBC.

Des études biochimiques et immunochimiques ont établi que l'antigène mitochondrial spécifique de la PBC est localisé sur la membrane mitochondriale interne et correspond à l'enzyme pyruvate déshydrogénase mitochondriale (PDH). Des études subséquentes ont constaté que le poids moléculaire de l'antigène de la PBC est 70 kD. L'antigène mitochondrial associé avec la PBC est la sous-unité E2 d'une famille d'enzymes fonctionnellement liée au complexe 2 oxo-acide déshydrogénase (2-OADC)⁵⁻⁷.

Le test ELISA par anticorps anti-mitochondries de type 2 ImmuLISA™ est un immunodosage spécifique et sensible pour la découverte des anticorps anti-mitochondries associés à la cirrhose biliaire primaire.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test est exécuté sous la forme d'une méthode de dosage immuno-enzymatique (ELISA) dans des micropuits enduits d'antigène mitochondrial purifié. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les micropuits en permettant aux anticorps anti-mitochondries qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner à l'antigène. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont incubés avec un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage des micropuits. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat vers un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités enzyme par millilitre (EU/ml).

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°-25°C) avant l'usage.

Quand elle est entreposée à 2°-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de la trousse. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux⁸.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN_3) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni









Test ELISA par anticorps anti-mitochondries ImmuLISA™ **REF** 1163

L'équipement contient des réactifs en suffisance pour procéder à 96 tests

12 x 8	MICROPLATE M2	Microplaques prêtes à l'usage avec micropuits individuels séparables enduits d'antigène anti-mitochondries.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A M2 *	Calibreur A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène anti-mitochondrial.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B M2 *	Calibreur B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène anti-mitochondrial.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C M2 *	Calibreur C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène anti-mitochondrial.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D M2 *	Calibreur D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant des anticorps de l'antigène anti-mitochondrial.
1 x 1,5 ml	CONTROL + M2 *	Régulation positive prête à l'emploi (<i>couvercle rouge</i>). Contient du sérum humain positif pour les anticorps anti-mitochondrial.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Régulation Négative prête à l'emploi (<i>couvercle blanc</i>). Contient du sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué phos. alc. Anti-IgG humain prêt à l'emploi. Codé en couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant de sérum prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat d'enzyme prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Conserver à l'abri de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Poudre Wash Buffer (solution de lavage). Reconstituer en un litre chacun.

* Contient <0.1% NaN_3

Symboles utilisés sur les étiquettes:

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée ou dispositif de lavage de microplaque automatique en mesure de dispenser 200 µl
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pour un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les échantillons de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Notes de procédure

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons patient doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est effectué de manière adéquate en dirigeant un flux énergétique de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.

- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

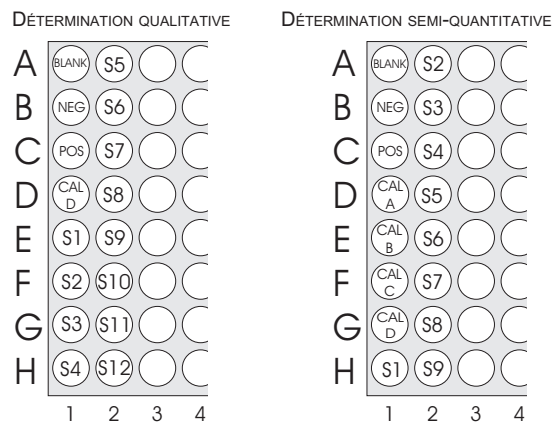
Méthode de test

Étape 1 Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

Étape 2 Étiqueter le feuillet de protocole pour indiquer l'emplacement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

Étape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (*fiolle avec couvercle jaune*).

ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibreurs A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



Étape 4 Préparer une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **0.5 ml** de diluant de sérum.

Étape 5 Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

Étape 6 Pipeter **100 µl** des calibreurs prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés conformément au feuillet de protocole.

Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.

Étape 7 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 8 Laver **4x** avec de la solution de lavage. Pour le lavage manuel, remplir chaque micropuits d'une solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Pour les dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage conformément aux instructions du fabricant.

Étape 9 Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.

Étape 10 Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.

Étape 11 Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.

Étape 12 Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.

FR

Étape 13 Incuber les micropuits pendant 30 minutes (± 5 min) à température ambiante.

Étape 14 Pipeter **100 μ l** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.

Étape 15 Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibre A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, la densité optique du Calibre D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs s'inscrivant dans la plage figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

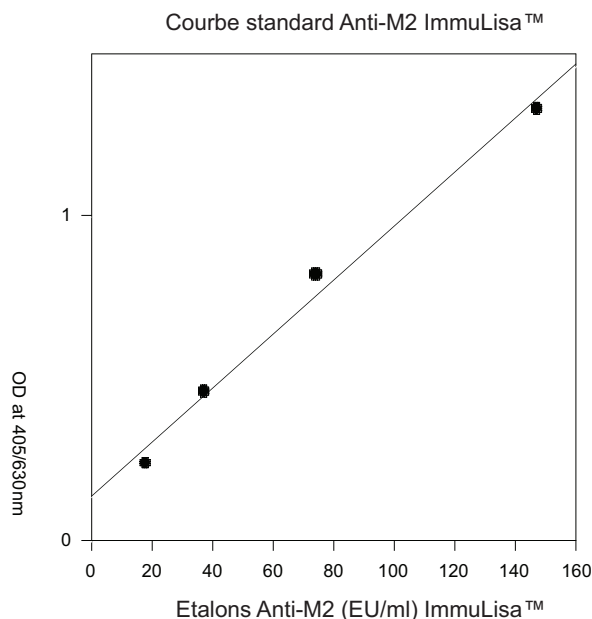
Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. du calibreur D}} \times \text{EU/ml du calibreur D} = \text{EU/ml échantillon de test}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibreur A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe meilleure. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.



FR

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales. Celles-ci peuvent varier en fonction de la population examinée.

Valeur anticorps anti-mitochondries AMA	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les résultats obtenus servent seulement comme aide dans le diagnostic et ne devraient pas être interprétés comme un diagnostic par eux-mêmes. Le sérum de certains patients atteints de cirrhose biliaire primaire peut être négatif pour les anticorps anti-mitochondries AMA.

VALEURS ATTENDUES

Incidence des AMA avec ELISA

Maladie	Incidence %
Cirrhose biliaire primaire	95-100
Hépatite autoimmune	0
Lupus érythémateux systémique	0
Polyarthrite rhumatoïde	0
Sclérodermie systémique	0

Note : L'incidence des AMA peut varier en fonction de la population de patients étudiée et des critères de sélection.

DONNÉES DE RENDEMENT

Le test par anticorps anti-mitochondries ImmuLisa™ a été comparé avec une trousse de test par immunofluorescence pour la détection des anticorps anti-mitochondries dans le sérum humain disponible dans le commerce.

Un total de 113 sérums a été obtenu d'un laboratoire de référence clinique. Ils ont été identifiés comme positif ou négatif pour les AMA par immunofluorescence indirecte et ont été testés conformément aux procédures recommandées par le fabricant. Les résultats sont repris dans le tableau :

Comparaison des méthodes ELISA et par immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps anti-mitochondries

		Positif	Négatif	Total
Autres ELISA	Positif	35	2	37
	Négatif	2	74	76
	Total	37	76	113

Accord : 96,5 %
Sensibilité : 94,6 %
Spécificité : 97,4 %

FR

Précision :

Sur la base de 10 mesures, le Coefficient de Variation intra et inter-dosage (CV) a été calculé et évalué comme se situant entre 5,4 et 9,5 % en fonction de la concentration de l'anticorps.

	Valeur moyenne (EU/ml)	CV inter-dosage	CV intra-dosage
Échantillon 1	146	5 %	7 %
Échantillon 2	82	10 %	7 %

Récupération :

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps anti-mitochondries ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des montants connus d'anticorps. Les niveaux des AMA des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues.

	Ab. conc. ajouté (EU/ml)	Ab. conc. obtenue (EU/ml)	% Récupération :
Échantillon 1	106	108	102
Échantillon 2	88	78	89
Échantillon 3	53	56	105

IT



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anticorpi anti-mitochondriali M2 (AMA) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1163 Anticorpi Anti-mitochondriali (M2) ELISA 96 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-mitochondriali (AMA) nel siero umano. La presenza degli AMA può essere usata in congiunzione alle evidenze cliniche e ad altri risultati di analisi di laboratorio per la diagnosi della cirrosi biliare primitiva.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La cirrosi biliare primitiva (CBP) è un'epatopatia caratterizzata da obliterazione infiammatoria dei dotti biliari intraepatici^{1,2}. Nei casi di PBC si riscontra la presenza di anticorpi anti-mitochondriali (AMA). Gli AMA rilevati per immunofluorescenza indiretta (IF) compaiono in circa il 90% dei pazienti con CBP e nel 3-10% dei pazienti con epatite autoimmune oltre che in alcune patologie quali la sifilide e l'epatite indotta da farmaci³. Sono state descritte nove reazioni di colorazione diverse prodotte con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta, ma solo una, la reazione M2, è specifica per la CBP⁴. L'inabilità di distinguere facilmente le diverse reazioni AMA compromette l'utilità del metodo di analisi IF per la diagnosi della CBP.

Studi biochimici e immunochimici hanno individuato che l'antigene mitocondriale specifico per la CBP è localizzato nella membrana mitocondriale interna ed è stato identificato essere l'enzima mitocondriale piruvato deidrogenasi (PHD). Studi successivi hanno identificato che l'antigene per la CBP ha un peso molecolare di 70kD. L'antigene mitocondriale associato con la CBP è la subunità E2 di una famiglia di enzimi correlati per funzione del complesso 2-oxo-acido deidrogenasi (2-OADC)⁵⁻⁷.

Il test per gli anticorpi anti-mitochondriali M2 (ELISA) ImmuLisa™ è un metodo di immunoanalisi specifico e sensibile per la rilevazione degli AMA associati con la CBP.

PRINCIPI DELLE METODICHE

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigeni mitocondriali purificati. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi anti-mitochondriali specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati sono incubati con coniugato anti IgG umane marcato con enzima. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rilevata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millilitro (EU)/ml.

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20°-25°C) prima dell'uso.

Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono

essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali⁸.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN_3) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi Anti-mitocondriali (M2) ELISA Immulisa™ **REF** 1163

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE M2	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene mitocondriale.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A M2 *	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi mitocondriali.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B M2 *	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi mitocondriali.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C M2 *	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi mitocondriali.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D M2 *	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi mitocondriali.
1 x 1.5 ml	CONTROL + M2 *	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per anticorpi mitocondriali.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso . Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN_3






Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

 Scadenza

IT

-  Temperatura di conservazione
-  Leggere le istruzioni per l'uso
-  Uso diagnostico in vitro
-  Produttore
-  Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito o lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

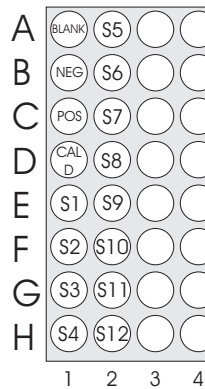
Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

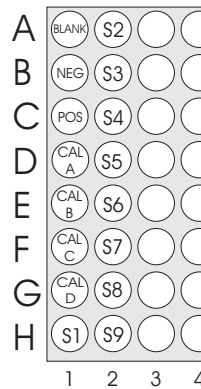
Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (fiala con tappo giallo), mentre per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA



DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

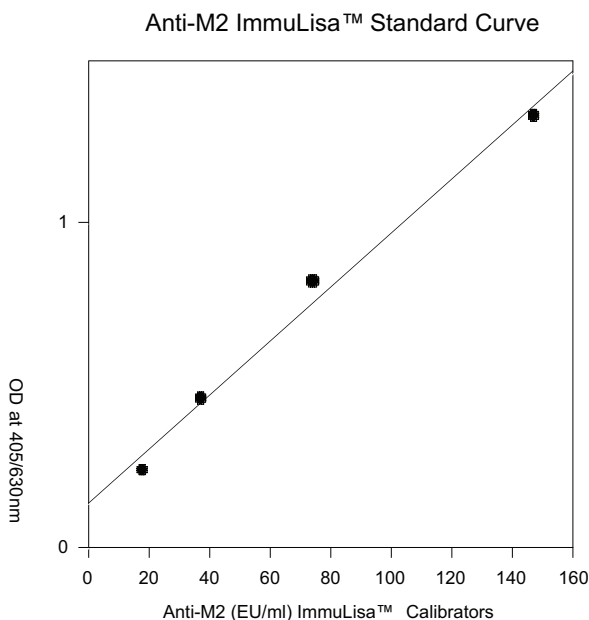
Assorbanza del campione del test

----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

IT

Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali che possono variare in base alla popolazione esaminata.

Valore AMA	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Borderline
>25 EU/ml	Positivo

LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi della CBP, ma considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. I sieri di alcuni pazienti possono risultare negativi per gli AMA.

VALORI ATTESI

Incidenza degli AMA in alcune patologie

Malattia	Incidenza %
Cirrosi biliare primitiva	95-100
Epatite autoimmune	0
Lupus eritematoso sistemico	0
Artrite reumatoide	0
Scleroderma sistemico	0

Nota: L'incidenza degli AMA può variare in base alla popolazione studiata e ai criteri di selezione.

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Il test Immulisa™ per la ricerca di anticorpi anti-mitochondriali è stato confrontato con altri kit di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi anti-mitochondriali nel siero umano disponibili in commercio.

113 sieri provenienti da un laboratorio clinico di riferimento sono stati identificati mediante immunofluorescenza indiretta come positivi o negativi per gli AMA. Questi sieri sono stati testati secondo la procedura raccomandata dal produttore. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

Confronto tra differenti metodi ELISA e IFA per l'individuazione di anticorpi AMA				
		Positivo	Negativo	Totale
Altro ELISA	Positivo	35	2	37
	Negativo	2	74	76
	Totale	37	76	113

Concordanza: 96,5 %

Sensibilità: 94,6 %

Specificità: 97,4 %

IT

Precisione:

Il coefficiente di variazione (CV) all'interno di uno stesso saggio tra un saggio e l'altro è stato calcolato sulla base dei risultati di 10 replicati ed è risultato essere di 5,4 e 9,5%, a seconda della concentrazione dell'anticorpo.

	Valore media (EU/ml)	inter-analisi %CV	intra-analisi %CV
Campione 1	146	5 %	7 %
Campione 2	82	10 %	7 %

Recupero:

I campioni con concentrazioni note di anticorpi AMA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di anticorpi AMA. Sono stati determinati i livelli degli anticorpi AMA nei campioni miscelati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero.

	Ass. conc. Addizionato (EU/ml)	Ass. conc. Ottenuto (EU/ml)	% Recupero
Campione 1	106	108	102
Campione 2	88	78	89
Campione 3	53	56	105

PT



IMMCO
DIAGNOSTICS

ELISA para Anticorpos Anti-mitocondriais M2 (AMA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1163 Anticorpos Anti-Mitocondriais (M2) 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção e semiquantificação de anticorpos anti-mitocondriais (AMA) em soro humano. A presença de AMA pode ser usada como auxílio em exames clínicos ou laboratoriais para o diagnóstico de cirrose biliar primária.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Cirrose Biliar Primária (CBP) é uma doença hepática caracterizada pela obliteração inflamatória dos canais biliares hepáticos^{1,2}. A CBP é caracterizada pela presença de anticorpos anti-mitocondriais (AMA). Os AMA detectados por imunofluorescência indirecta (IF) apresentam-se em aproximadamente 90% dos doentes com CBP e em 3 a 10% dos doentes com hepatite auto-imune bem como noutros problemas, tais como sífilis e hepatite induzida por medicamentos³. Foram descritas nove reacções de coloração diferentes por IF indirecta, mas apenas uma, a reacção M2, é específica de CBP⁴. A dificuldade em distinguir facilmente as diferentes reacções AMA compromete a utilidade dos métodos de IF indirecta no diagnóstico da CBP.

Estudos bioquímicos e imunoquímicos identificaram o antígeno mitocondrial específico da CBP na membrana mitocondrial interna e foi identificado como sendo a enzima mitocondrial piruvato desidrogenase (PDH). Mais tarde, outros estudos identificaram o antígeno CBP como tendo peso molecular de 70 kD. O antígeno mitocondrial associado à CBP é a subunidade E2 de uma família de enzimas relacionadas funcionalmente do complexo 2-oxiácido desidrogenase (2-OADC)⁵⁻⁷.

O ELISA para Anticorpos Anti-mitocondrial M2 ImmuLisa™ é um imunoensaio específico e sensível para a detecção dos AMA associados com a CBP.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é efectuado como um teste de imunoabsorção marcado com enzima de fase sólida (ELISA) em micropoços revestidos com antígeno mitocondrial purificado. Os controlos, calibradores e amostra de soro do doente são incubados nos micropoços o que permite a ligação dos anticorpos anti-mitocondriais presentes no soro ao antígeno. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram são incubados com um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima. O conjugado que não tiver aderido é eliminado por lavagem dos micropoços. Depois junta-se um Substrato enzimático específico (pNPP) aos poços e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato num produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em unidades de enzima por mililitro (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.**

Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização.

Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

PT

Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais⁸.

AVISO: A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

Materiais fornecidos









ELISA para Anticorpos Anti-Mitocondriais (M2) ImmuLisa™ **REF** 1163

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	MICROPLATE M2	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio mitocondrial
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A M2 *	Calibrador A pronto a usar (<i>tampa verde</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-mitocondriais.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B M2 *	Calibrador B pronto a usar (<i>tampa violeta</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-mitocondriais.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C M2 *	Calibrador C pronto a usar (<i>tampa azul</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-mitocondriais.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D M2 *	Calibrador D pronto a usar (<i>tampa amarela</i>). Soro humano contendo anticorpos anti-mitocondriais.
1 x 1,5 ml	CONTROL + M2 *	Controlo positivo pronto a usar (<i>tampa vermelha</i>). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-mitocondriais.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém <0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído ou Lavador Automático de Microplacas com a capacidade de distribuir 200 µl
- Pipetas para 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO**Notas sobre o procedimento**

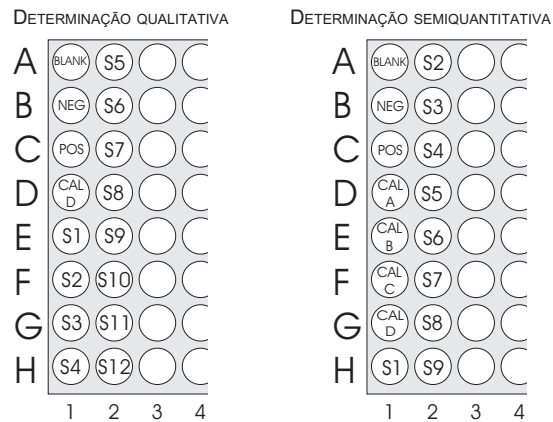
- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adicionamento de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e com na mesma sequência.

PT

- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no frigorífico.

Método do teste

- Passo 1** Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.
- Passo 2** Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste nas amostras em duplicado.
- Passo 3** Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo, pronto a usar, (*frasco com tampa amarela*).
ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D, prontos a usar, como descrito no esquema abaixo.



- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:101** da amostra do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **0,5 ml** de Diluente para Soro.
- Passo 5** Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente os micropoços no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores, prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nos respectivos micropoços de acordo com a folha de protocolo.
Nota: Inclua também um micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força as poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como no Passo 8.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.

PT

Passo 15 Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser < 0,3. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser <20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar as UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

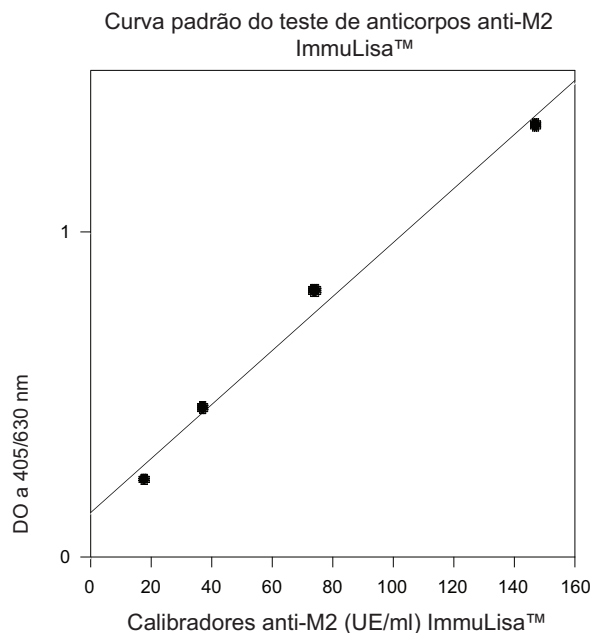
Abs. da Amostra de Teste

----- X UE/ml do Calibrador D = UE/ml da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe a concentração em UE/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.



PT

Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais. Esses poderão variar em função da população examinada.

Valor AMA	Interpretação
<20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limite)
>25 UE/ml	Positivo

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os resultados obtidos servem apenas como auxílio do diagnóstico de CBP e não deverão ser interpretados já como um diagnóstico. O soro de alguns doentes com CBP poderá dar negativo para AMA.

VALORES PREVISTOS

Incidência de AMA por ELISA

Doença	Incidência %
Cirrose Biliar Primária	95-100
Hepatite Auto-imune	0
Lúpus Eritematoso Sistémico	0
Artrite Reumatóide	0
Esclerodermia Sistémica	0

Nota: A incidência de AMA poderá variar em função da população de doentes estudada e do critério de selecção.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O teste de anticorpos anti-mitocondriais ImmuLisa™ foi comparado com um kit de teste de imunofluorescência indirecta obtido no comércio para a detecção de anticorpos anti-mitocondriais em soro humano.

Foi obtido um total de 113 soros num laboratório clínico de referência. Foram identificados como positivos ou negativos para AMA por imunofluorescência indirecta e foram testados de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados estão resumidos na seguinte Tabela:

Comparação entre ELISA e IFA na detecção de AMA

		Positivo	Negativo	Total
Outro ELISA	Positivo	35	2	37
	Negativo	2	74	76
	Total	37	76	113

Concordância: 96,5 %
Sensibilidade: 94,6 %
Especificidade: 97,4 %

PT

Precisão:

Baseado em 10 repetições, o coeficiente de variação (CV) intra-testes e inter-testes foi calculado e registado entre 5,4 e 9,5%, dependendo da concentração do anticorpo:

	Valor médio (UE/ml)	Inter-testes CV	Intra-teste CV
Amostra 1	146	5%	7%
Amostra 2	82	10%	7%

Recuperação:

Amostras com concentrações conhecidas de AMA foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas. Foram determinados os níveis de AMA das amostras misturadas e a partir dos valores obtidos foi calculada a percentagem de recuperação:

	Conc. Ab. adicionada (UE/ml)	Conc. Ab. obtida (UE/ml)	% Recuperação
Amostra 1	106	108	102
Amostra 2	88	78	89
Amostra 3	53	56	105

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis, Review. *N Engl J Med*; 1987, 316:521-528.
2. Colucci G, Schaffner F and Paronetto F. In situ characterization of the cell-surface antigens of the mononuclear cell infiltrates and bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol & Immunopathol*; 1986, 41:35-.
3. Patrick SC, Leung, Ross L et al. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Seminars Liv Dis*; 1997, 17:61-69.
4. Berg PA, Klein R, Lindenborn-Fotinos J et al. Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies. *Lancet*; 1982, 2:1423-1426.
5. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, and Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet*; 1988, 2:1067-1070.
6. Van de Water J, Gershwin ME, Leung P et al. The autoepitope of the 74-kD mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis corresponds to the functional site of dihydrolipoamide acetyltransferase. *J Exp Med*; 1988, 167:1791-1799.
7. Fussey SM, Ali ST, Guest JR et al. Reactivity of primary biliary cirrhosis sera with *Escherichia coli* dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p); characterization of the main immunogenic region. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1990, 87:3987-3991.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control National Institutes of Health; 1993 (HHS Pub No [CDC] 93-8395).
9. N. Zurgil, R. Bakimer, M. Kaplan et al. Anti-pyruvate dehydrogenase autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol*; 1991, 5:239-245.



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com