

## **REAADS Mitochondria M2**

Cat. No. 10877: 96 wells  
Cat. No. 10877: 96 puits  
Art.-Nr. 10877: 96 Auftragsstellen  
Cat. No. 10877: 96 pocillos  
Cat. n. 10877: 96 pozzetti



---

11575 Main Street, Suite 400, Broomfield, Colorado 80020 USA

Tel: 303-457-4345 Fax : 303-457-4519 [www.corgenixonline.com](http://www.corgenixonline.com)

- CONTENTS -  
- CONTENU -  
- INHALTSVERZEICHNIS -  
- CONTENIDO -  
- CONTENUTI -  
- CONTENDO -  
- ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ -

English.....	3
Français.....	9
Deutsch.....	15
Español.....	21
Italiano.....	27
Symbols/Symboles/Symbole/Simbolos/Simboli.....	33

## English

### INTENDED USE

The REAADS Mitochondria M2 is semi-quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-Mitochondrial antibodies in human serum. The REAADS Mitochondria M2 is intended for in vitro diagnostic use as an aid in the diagnosis of primary biliary cirrhosis.

### SUMMARY AND EXPLANATION

Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune liver disease named in 1950 by Ahrens et al. PBC is a disease caused by chronic inflammation of thin bile duct of the liver, making it difficult for the bile to flow, and the bile remains in the liver. Anti Mitochondrial antibodies occur frequently in patients with PBC and their presence constitutes one of the diagnostic criteria of the disease. Berg et al. classified corresponding antigen to AMA into M1-M9 and found anti M2 antibody is the most specific antibody to PBC. In 1988, it was reported by Gershwin, et al. that main corresponding antigen to anti M2 antibody is E2 component of pyruvate dehydrogenase complex (PDC). It is further reported that subunit (BCOADC-E2, OGDC-E2) of the enzyme which belongs to 2-acid dehydrogenase complex is also a corresponding antigen to M2 antibodies, and reported by Motegi et al. that antibodies which react only to one of them is present in approximately 5-6 % of sera from patient with PBC.

The REAADS Mitochondria M2 is for measuring anti-Mitochondrial antibodies present in the serum with high sensitivity by ELISA.

### PRINCIPLE

The REAADS Mitochondria M2 measures anti-Mitochondrial antibodies present in the serum by ELISA. Calibrators, Controls and patient serum are added to microwell coated with mitochondria M2 antigens, allowing anti-Mitochondrial antibody to react with the immobilized antigen (Sample incubation). After washing to remove any unbound serum proteins, horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG, IgA and IgM are added and incubated (Conjugate incubation). Following another washing step, peroxidase substrate is added and incubated for an additional period of time (Substrate incubation). Acid solution is then added to each well to terminate the enzyme reaction and to stabilize the color development. The assay can be quantified by measuring the reaction photometrically and calculating the results.

### BRIEF ASSAY PROCEDURE

	Add 100 µL of diluted sample (1:101) to each well of microwell plate
<Sample incubation> (20-25°C) 60 min.	↓ Wash ↓
	Add 100 µL of conjugate solution to each well
<Conjugate incubation> (20-25°C) 60 min.	↓ Wash ↓
	Add 100 µL of substrate to each well
<Substrate incubation> (20-25°C) 30 min	↓ Add 100 µL of stop solution to each well ↓ Read absorbance ↓ Interpretation of result

## **REAGENTS AND STORAGE**

### **1) MICROWELL STRIPS**

96 wells MICROWELL STRIPS (12 x 8 wells) coated with antigens produced from recombinant purified proteins, the breakaway strips packaged in a strip holder and sealed in a foil envelope with desiccant, are stable at 2-8°C until the labeled expiration date.

### **2) CALIBRATOR 1 (0 U/mL)**

Two vials containing 1.5 mL of Assay Diluent including 0.1% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **3) CALIBRATOR 2 (100 U/mL)**

Two vials containing 1.5 mL each of anti-Mitochondrial antibody positive human serum with Assay Diluent including 0.1% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **4) CONJUGATE REAGENT**

One vial containing 15 mL of horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG, IgA and IgM (heavy chain specific), HEPES, Proclin 150 and BSA. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **5) ASSAY DILUENT**

Two 50 mL bottles containing PBS, Tween-20, and 0.1% sodium azide. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **6) WASH CONCENTRATE (10X)**

One 100 mL bottle containing PBS and Tween 20 as a 10X concentrate. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **7) SUBSTRATE SOLUTION**

One 20 ml bottle containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/hydrogen peroxide (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **8) STOP SOLUTION**

One 20 mL bottle containing 1N Sulfuric acid. Ready to use. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **9) POSITIVE CONTROL SERUM**

One vial containing 0.2 mL of anti-Mitochondrial antibody positive human serum with 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

### **10) NEGATIVE CONTROL SERUM**

One vial containing 0.2 mL of anti-Mitochondrial antibody negative human serum with 0.1% sodium azide. Stable at 2-8°C until labeled expiration date.

## **PRECAUTIONS**

- (1) This product is for in vitro diagnostic use only.
- (2) Do not use kit components beyond the stated expiration dates.
- (3) Avoid contact of reagents with eyes, skin and clothing. Reagents on skin must be washed away with plenty of water. TMB contains irritant and Stop Solution consists of a 1N sulfuric acid, which is a poison and corrosive.
- (4) Calibrator 2, Positive control and Negative control are derived from human serum, in which HBs antigen, HCV antibody and HIV antibody has not been detected. No test method, however, can guarantee the absence of these or any other infectious agents. These reagents and all patient samples should be handled as if they are capable of transmitting AIDS, hepatitis or any other infectious diseases.

- (5) Calibrator 1, Calibrator 2, Positive control, Negative control and Assay Diluent contain sodium azide (0.1%) as a preservative and must be handled with caution - do not ingest or allow contact with skin or mucous membranes. Sodium azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush with plenty of water when disposing materials containing sodium azide into a drain.
- (6) Some kit components contain animal origin materials, which are from non-infectious animals. These components, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (7) Matching lot numbers of Microwell strips, Conjugate and Calibrator 2 must be used together in the assay. Do not substitute reagents from other kits.
- (8) All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) before starting the assay.
- (9) Do not expose the kit to direct sun during assay and storage.
- (10) Avoid microbial and cross contamination of reagents or samples.
- (11) Incubation temperatures above or below normal room temperature (20-25°C), shorter or longer time periods of incubation and inaccurate dilution may give erroneous results.
- (12) The wells must be rinsed with Wash Solution properly enough to avoid false positive.
- (13) Carefully pipette not to foam each sample and reagent to avoid cross contamination between microwells.
- (14) All microwell strips, which are not immediately required, should be returned to the zip lock pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.
- (15) Wash concentrate may become turbid at 2-8°C, which does not cause inconsistent results.
- (16) Implement used for the test should be disposed or treated as shown below.  
Soak in 2% final conc. glutaraldehyde solution for more than 1 hour or soak in 0.5% Sodium hypochlorite solution (available chlorine: approx. 5000ppm) for more than 1 hour or autoclave at 121°C for more than 20 minutes.
- (17) The Mitochondrial antibodies value obtained from this assay are an aid to diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedure.

### **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Microplate reader (wavelength: 450 nm, 620 nm/reference)
- Multichannel micropipette (e.g. 100 µL - 300 µL) for dispensing conjugate, substrate, and stop solution.
- Single channel pipette (10 µL & 100 µL)
- Reagent reservoir
- Autowasher or wash bottle
- Deionized or distilled water
- One liter graduated cylinder for preparation of wash solution
- Test tubes for patient sample dilutions (e.g. 1000 µL)
- Disposable pipette tips
- Paper towels
- Basin and disinfectant
- Microplate cover

## **PROCEDURE**

### ■ **PREPARATION OF REAGENTS**

- Bring all assay materials to room temperature (20-25°C) prior to use.
- Microwell Strips: Remove required microwell strip from pouch and place them in the frame. Promptly return unused strips to refrigerated storage.
- Wash Solution: Prepare 1:10 dilution of The Wash Concentrate prior to use.(ex. add 100 mL of Wash Concentrate to 900 mL of distilled water). The diluted wash solution is stable for 2 weeks at 2 -8°C.
- Do not dilute Calibrator 1, Calibrator 2, Conjugated Reagent, Assay Diluent, Substrate and Stop Solution, which are ready-to-use.

### ■ **PREPARATION OF SAMPLES/CONTROLS**

- Dilute each patient serum, Positive Control and Negative Control 1:101 by adding 10µL of serum to 1mL of Assay Diluent.

\*Diluted samples must be used within a day.

\*Assay Diluent may form precipitate, which does not cause inconsistent results.

- The controls should be treated in the same way as a patient serum.
- Use fresh patient sera. If storage is needed, they should be frozen below -20°C for up to one month, below -70°C for longer storage. Do not repeat freezing and thawing.

\*In case stored below -20°C for more than 6 months or freezing and thawing repeatedly, nonspecific results are obtained because of IgG denaturation.

### ■ **ASSAY PROCEDURE**

#### **STEP 1. (SAMPLE INCUBATION)**

Using the multi-channel pipetor, transfer 100µL of each diluted sample, Positive and Negative Controls into the appropriate microwells of the antigen test plate. Add Calibrators directly to appropriate wells. (Do not dilute calibrators.)

\* Incubation starts on pipetting to the antigen-coated microwells. Pipetting should be completed as quickly as possible.

Cover wells with a plate sealer and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

#### **STEP 2. (WASHING)**

Aspirate or discard the well contents. Fill the well with Wash Solution and then completely aspirate or discard the contents. Wash 4 times. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining Wash Solution. When autowasher is used, wash 4 times.

\* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and set- up.

\* Wash Solution should be used at 20-25°C.

#### **STEP 3. (CONJUGATE INCUBATION)**

Pour Conjugated Reagent into a reservoir. Add 100 µL of the Conjugated Reagent to each well with multichannel pipette. Cover wells with the plate sealer and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

#### **STEP 4. (WASHING)**

Wash the microplate following the STEP 2 procedure.

### STEP 5. (SUBSTRATE INCUBATION)

Pour Substrate into a reservoir and pipette 100 µL of the Substrate to each well with multichannel pipette.

\* The reservoir should be different from the one, which was used for pouring conjugate solution. A new disposable reservoir should be used because Substrate is easily oxidized by metal ion.

\* The Substrate, once poured in a reservoir, should not be returned to the bottle.

Cover wells with the plate sealer and incubate for 30 minutes at room temperature (20-25 °C).

### STEP 6. (STOP REACTION)

Pour Stop Solution into a reservoir. Pipette 100 µL of the solution to each well with multichannel pipette.

#### ■ READING

Read the absorbance of each well at 450 nm. If a dual wave-length plate reader is available, set the test wavelength at 450 nm and the reference at 620 nm.

\* Reading should be done as quickly as possible after stopping the reaction.

\* Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before reading the plate.

#### ■ CALCULATION OF RESULT

$$\text{Unit value (U/mL)} = \frac{(A_{450}\langle\text{Sample}\rangle - A_{450}\langle\text{Calibrator 1}\rangle)}{(A_{450}\langle\text{Calibrator 2}\rangle - A_{450}\langle\text{Calibrator 1}\rangle)} \times 100$$

\*A<sub>450</sub> is abbreviation of absorbance value at 450 nm.

\*An international reference material for anti-Mitochondria antibodies is not available. The assay is calibrated in relative arbitrary units.

#### ■ QUALITY CONTROL

Each assay result should meet the following criteria.

A<sub>450</sub> of Calibrator1: ≤0.150

A<sub>450</sub> of Calibrator2: ≥0.700

The Positive and Negative Controls must give the following results:

	Positive Control	Negative Control
anti-Mitochondrial Ab Value (U/mL)	≥50	<7

If any of these are not met, the results are invalid and the test should be repeated.

Before repeating assay, check the following procedure.

- Incubation Temperature
- Incubation Period of Time
- Washing

## **TEST INTERPRETATION AND EXPECTED VALUES**

The following is intended only as a guide for interpretation. Each laboratory is recommended to establish its own criteria for test interpretation based on sample populations typically encountered.

anti-Mitochondrial Ab value (U/mL)	Interpretation
< 7	Negative for anti-Mitochondria M2 Ab
Greater than or equal to 7	Positive for anti-Mitochondria M2 Ab

### ■ **LIMITATIONS**

As with other diagnostic test procedures, the results obtained with the REAADS Mitochondria M2 serve only as an aid to diagnosis and should not be interpreted as diagnostics in themselves.

## **PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

### ■ **CLINICAL SPECIFICITY AND SENSITIVITY**

Disease	Positive sample	Positive rate
PBC	111/123	90.2%
AIH I	1/27	3.7%
AIH II	0/4	0.0%
HBV	0/44	0.0%
HCV	2/46	4.3%
Normal Serum	3/168	1.8%

PBC: Primary biliary cirrhosis

AIH: Autoimmune hepatitis

HBV: Hepatitis B virus

HCV: Hepatitis C virus

### ■ **PRECISION**

Repeatability was demonstrated by testing 3 samples in sextuple. Reproducibility was determined by testing 3 samples on 5 different days (day-to-day) and by testing 3 samples in 3 lots (lot-to-lot). %CV values for reproducibility and repeatability were below 15% for each sample.

### ■ **ASSAY RANGE**

The assay range of this kit is from 5 U/mL to 300 U/mL.

### ■ **INTERFERING SUBSTANCES**

Hemoglobin (up to 480 mg/dL), Bilirubin (up to 20.0 mg/dL), chyle (up to 2,780 unit as Formazine) and/or Rheumatoid Factor (up to 520 IU/mL) are not affective on the assay result, but avoid using highly hemolysed samples or highly lipemic samples.

## **REFERENCES**

1. Berg, P.A. et al: Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. J.Hepatol, 1986, 2 :123
2. Gershwin, M.E. et al: Identification of the mitochondrial enzymes that react with autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. FASEB J., 1988, 2 :2344
3. Leung PS, et al: Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. Hepatology 1995, 22: 505-513
4. Moteki S et al: Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domains for the detection of antimitochondrial autoantibodies. Hepatology 1996, 24: 97-103

## **Français**

### **BUT DU DOSAGE**

Le REAADS Mitochondrie M2 est une trousse de dosage semi-quantitative ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) pour la détection d'anticorps anti-Mitochondrie dans le sérum humain. Le but du REAADS Mitochondrie M2 est situé dans le diagnostic in vitro comme moyen de diagnostic différentiel de cirrhose biliaire primitive.

### **RESUME ET EXPLICATION**

La cirrhose biliaire primitive (CBP) est une maladie auto immune (Ahrens et al, 1950) du foie caractérisée par la destruction spécifique et l'oblitération des voies biliaires intra-hépatiques. La manifestation sérologique majeure de cette affection est la production d'anticorps anti-Mitochondries (AMA). Ces anticorps réagissent avec des cibles antigéniques multiples intra-mitochondriales nommées M1 à M9. L'antigène M2 a été démontré par Berg et al. comme étant un marqueur spécifique de la CBP. En 1988, Gershwin et al. ont montré que la cible M2 était le composant E2 du complexe pyruvate-déshydrogénase (PDH). On a montré depuis que les sous-unités (BCOADC-E2, OGDC-E2) de l'enzyme appartenant au complexe 2-acid-déshydrogénase correspondaient également à l'antigène M2 et Motegi et al. ont montré que les anticorps réagissant avec seulement une seule de ces sous-unités sont présents chez 5 à 6% des sérums de patients présentant une CBP.

REAADS Mitochondrie M2 est une trousse ELISA permettant de mesurer avec une grande sensibilité la présence d'auto anticorps anti-M2 dans le sérum.

### **PRINCIPE DU TEST**

La trousse REAADS Mitochondrie M2 permet de mesurer la concentration des anticorps anti-M2 présents dans le sérum. Des sérums contrôles, calibrateurs et des sérums de patients sont ajoutés dans des micro-puits sensibilisés avec les antigènes recombinants M2. Les anticorps anti-M2 vont se lier aux molécules de M2 immobilisées (Étape d'incubation avec l'antigène). Après une étape de lavage permettant d'éliminer les protéines non liées, un anticorps de chèvre anti-IgG, IgA et IgM humaine conjugué à la peroxydase est ajouté (Étape d'incubation du conjugué). Après une deuxième étape de lavage, du substrat peroxydase est ajouté (Étape d'incubation du substrat). Puis une solution stop (acide sulfurique) est ajoutée dans chaque puits pour arrêter le développement de la réaction. Ce test peut être quantifié en mesurant l'intensité de la réaction au spectrophotomètre et en faisant le calculant des résultats.

### **PROTOCOLE SIMPLIFIE**

	Ajouter dans les micro-puits sensibilisés à M2:
	Echantillon dilué au 1 : 101 (100 µL)
<Incubation de l'échantillon> (20-25°C) 60 min.	↓ Laver
	↓ Solution de conjugué (100 µL)
<Incubation du conjugué> (20-25°C) 60 min.	↓ Laver
	↓ Substrat (100 µL)
<Incubation du substrat> (20-25°C) 30 min.	↓ Solution d'arrêt (100 µL)
	↓
Lecture de l'absorbance à 450 nm	↓
	Interprétation des résultats

## **REACTIFS FOURNIS ET STOCKAGE**

### **1) MICRO PLAQUE**

12 Barrettes de 8 micropuits sensibilisés avec des antigènes faits de protéines purifiées recombinantes, les bandes de séparation emballées dans un porte-bandes et cachetées dans une enveloppe de papier aluminium avec du dessicant, sont stables à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **2) CALIBRATEUR 1 (0 U/mL)**

Deux flacons avec 1,5 mL du diluant sérum comprenant 0,1% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **3) CALIBRATEUR 2 (100 U/mL)**

Deux flacons avec 1,5 mL de sérum humain positif d'anticorps anti-Mitochondrie avec du diluant sérum comprenant 0,1% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **4) CONJUGUE**

Un flacon avec 15 mL des anticorps de chèvre anti-IgG, IgA et IgM (spécifique d'une chaîne lourde) humain couplés à de la peroxydase, HEPES, Proclin 150 et de l'albumine bovine. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **5) DILUANT SERUM**

Deux flacons avec 50 mL de PBS, de Tween-20, et 0,1% d'azide sodium. Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **6) SOLUTION DE LAVAGE (10X)**

Un flacon avec 100 mL de PBS et de Tween 20 comme un concentré 10x. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **7) SUBSTRAT**

Un flacon avec 20 mL de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride/peroxide hydrogène (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **8) SOLUTION D'ARRET**

Acide sulfurique 1 N (1x20 mL). Prêt à l'emploi. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **9) CONTROLE POSITIF**

Un flacon contenant 0,2 mL de sérum humain positif d'anticorps anti-Mitochondrie avec 0,1% d'azide sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

### **10) CONTROLE NEGATIF**

Un flacon contenant 0,2 mL de sérum humain négatif d'anticorps anti-Mitochondrie avec 0,1% d'azide sodium. Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée.

## **PRECAUTIONS**

- (1) Pour utilisation en diagnostic in vitro uniquement.
- (2) Ne pas utiliser les éléments de la trousse après la date de péremption indiquée.
- (3) Eviter tout contact des réactifs avec les yeux, la peau ou les vêtements. En cas de contact des réactifs avec la peau, laver avec beaucoup d'eau. TMB contient des matières irritantes et la Solution d'arrêt consiste en un acide sulfurique 1N, qui est toxique et corrosif.

- (4) Le Calibrateur 2, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif sont préparés à partir de sérums humains, qui ont été testés négatifs pour l'antigène HBs, les anticorps anti-HCV, HIV-1 et HIV-2. Aucune méthode ne pouvant garantir l'absence de ces virus ou d'autres virus pathogènes. Ces réactifs et tous les échantillons des patients doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre le SIDA, l'hépatite ou d'autres maladies infectieuses.
- (5) Les calibrateurs (1 & 2), le Contrôle Positif, le Contrôle Négatif et le diluant sérum contiennent 0,1% d'azide de sodium comme conservateur et doivent être manipulés avec précaution – ne pas ingérer ou permettre du contact avec la peau ou avec les membranes muqueuses. L'azide peut provoquer des réactions explosives dans les conduites en fer ou cuivre. Faire couler l'eau en abondance lorsqu'on se débarrasse de ces produits.
- (6) Certains composants de la trousse contiennent des matières d'origine animale, provenant d'animaux non-infectés. Cependant, ces composants doivent être manipulés comme des dangers biologiques potentiels, lors de l'utilisation ainsi que lors du traitement des déchets.
- (7) Utiliser obligatoirement les mêmes lots de barrettes de micro puits, de solution de conjugué et de Calibrateur 2. Ne pas substituer des réactifs d'autres trousse.
- (8) Ramener tous les composants de la trousse à température ambiante (20-25°C) avant emploi.
- (9) Ne pas exposer les éléments de la trousse à la lumière pendant son utilisation ou sa conservation.
- (10) Eviter la contamination croisée et microbienne des réactifs ou des échantillons.
- (11) Une température d'incubation en deçà ou au-delà de la température ambiante (20-25°C) ainsi que des temps d'incubation augmentés ou raccourcis ou des dilutions imprécises peuvent donner des résultats erronés.
- (12) Les puits doivent être lavés de façon correcte et suffisante avec la solution de lavage pour éviter d'obtenir des résultats faux positives.
- (13) Pipeter de façon à éviter la formation de bulles dans les échantillons et les réactifs pour éviter la contamination croisée entre les micro-puits.
- (14) Remettre dans le sachet à fermeture éclair les barrettes de micro puits non utilisées, bien refermer cet étui pour empêcher une hydratation des réactifs.
- (15) La solution de lavage concentrée peut être trouble à 2-8°C, sans pour autant influencer la qualité des résultats obtenus. Avant de préparer la solution de lavage, bien agiter la solution concentrée.
- (16) Le matériel utilisé pour le test doit être jeté ou traité comme indiqué ci-dessous.  
Tremper dans une solution glutaraldéhyde à concentration finale 2% pendant plus d'une heure ou tremper dans une solution sodium hypochlorite 0,5% (chlorine disponible: approx. 5000ppm) pendant plus d'une heure ou autoclaver à 121 °C pendant plus de 20 minutes.
- (17) Les valeurs d'anticorps anti-Mitochondrie obtenus par ce test ne sont qu'un moyen de diagnostic. Chaque médecin doit interpréter ces résultats dans le cadre de l'histoire du patient, des constats médicaux et d'autres procédures diagnostiques.

### **MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI**

- Lecteur de micro plaque (longueur d'onde: 450nm, 620 nm/référence)
- Pipette multicanaux (p.e. 100µL – 300µL) pour distribuer le conjugué, le substrat et la solution d'arrêt.
- Pipette automatique (10µL & 100µL)
- Réservoir des réactifs
- Laveur de micro plaque ou flacon pour le tampon de lavage
- Eau désionisée ou distillée
- Verre gradué d'un litre pour la préparation de la solution de lavage

- Eprouvettes pour la dilution des échantillons du patient (e.g.1000µL)
- Pointes de pipette jetables
- Serviettes en papier
- Bassin et désinfectant
- Couverture de micro-plaque

## **PROCEDURE**

### ■ **PREPARATION DES REACTIFS**

- Amener tous les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.
- Micro plaque: Retirer le nombre de barrettes nécessaire du sachet et les placer dans le support. Remettre immédiatement au réfrigérateur les barrettes non utilisées.
- Solution de lavage: La solution de lavage concentrée doit être diluée avant emploi. Diluer au 1 : 10. (p.e. ajouter 100 mL de Concentré de Lavage à 900 mL d'eau distillée). La solution de lavage diluée est stable pendant 2 semaines à 2-8°C.
- Ne pas diluer les Calibrateurs (1 & 2), Conjugué, Diluant Sérum, Substrat et Solution d'arrêt, qui sont prêts à utiliser.

### ■ **PREPARATION DES PRELEVEMENTS**

- Diluer chaque sérum de patient, chaque Contrôle Positif et Négatif 1:101 en ajoutant 10µL de sérum à 1mL de Diluant de Test.

\*Les échantillons dilués doivent être utilisés le jour même.

\*Le Diluant de Test peut former de la précipitation, ce qui ne provoque pas de résultats inconsistants.

- Les contrôles doivent être traités comme le sérum de patient.
- Utiliser des sérums fraîchement prélevés. Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, aliquoter et congeler à – 20°C pour un mois ou à – 70°C pour une plus longue période. Eviter les étapes de congélation-décongélation.

\*En cas de stockage au-dessous de -20°C pendant plus de 6 mois ou en cas de congélation-décongélation successive, des résultats non-spécifiques sont obtenus à cause de la dénaturation d'IgG.

### ■ **PROTOCOLE**

#### **PHASE 1. (INCUBATION DE L'ECHANTILLON)**

Transférer 100µL de chaque échantillon dilué et de chaque Contrôle Positif et Négatif dans les micropuits appropriés de la plaque de test d'antigène, utilisant la pipette multicanaux. Ajouter les Calibrateurs directement aux puits appropriés. (Ne pas diluer les Calibrateurs.)

\*L'incubation démarre au moment où les échantillons sont déposés dans les micro-puits. Procéder le plus rapidement possible à cette étape.

Recouvrir les puits avec un cachet et incuber à température ambiante (20-25°C) pendant 60 minutes.

#### **PHASE 2. (LAVAGE)**

Aspirer ou éliminer le contenu des puits. Remplir les puits avec la solution de lavage et aspirer complètement ou éliminer le liquide. Faire 4 lavages. Retourner la plaque sur un papier absorbant et tapoter pour éliminer tout le liquide. Si le laveur automatique est utilisé, laver 4 fois.

\*On recommande à chaque laboratoire d'établir ses propres conditions de lavage (mise en place et temps).

\*La solution de lavage doit être à température ambiante (20-25°C).

### PHASE 3. (INCUBATION DU CONJUGUE)

Transférer la solution de conjugué dans le réservoir. Pipeter 100 µL de la solution de conjugué dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux. Recouvrir les puits avec un cachet et incubé à température ambiante (20-25°) pendant 60 minutes.

### PHASE 4. (LAVAGE)

Laver la micro-plaque selon la procédure de la PHASE 2.

### PHASE 5. (INCUBATION DU SUBSTRAT)

Transférer la solution de substrat dans un réservoir. Pipeter 100 µL de la solution de substrat dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux.

\*Ce réservoir doit être différent de celui utilisé pour la solution de conjugué. Un réservoir neuf doit être utilisé car la solution de substrat est facilement oxydée par la présence d'ions métalliques.

\*Le Substrat, dès qu'il a été transféré dans un réservoir, ne peut pas être remis dans la bouteille.

Recouvrir les puits avec un cachet de plaque et incubé à température ambiante (20-25°C) pendant 30 minutes.

### PHASE 6. (ARRET DE LA REACTION)

Transférer la solution d'arrêt dans un réservoir. Pipeter 100 µL de cette solution dans chaque puits avec une pipete multicanaux.

## ■ LECTURE

Lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm. Si on utilise un lecteur avec un double faisceau, lire les puits à 450 nm et la référence à 620 nm.

\*La lecture doit être effectuée aussi vite que possible après avoir arrêté la réaction.

\*Vérifier si le fond de la plaque est propre et sec, et s'il n'y a pas de bulles à la surface de la liquide des puits avant de lire la plaque.

## ■ CALCUL DES RESULTATS

$$\text{Valeur Index} = \frac{DO_{450 \text{ nm}} \text{ Ech} - DO_{450 \text{ nm}} \text{ Cal. 1}}{DO_{450 \text{ nm}} \text{ Cal. 2} - DO_{450 \text{ nm}} \text{ Cal. 1}} \times 100$$

\*DO<sub>450 nm</sub> est la valeur de l'absorbance à 450 nm.

\* Il n'y a pas de données de référence internationales pour des anticorps anti-Mitochondrie; le test est calibré en unités relativement arbitraires.

## ■ VALIDATION DES RESULTATS

Pour valider le test, tenir compte des indications suivantes.

La D.O<sub>450 nm</sub> du Calibrateur 1 ne doit pas être ≤0,150

La D.O<sub>450 nm</sub> du Calibrateur 2 doit être supérieure >0,700

Les contrôles positifs et négatifs doivent donner les résultats suivants:

	Positive Control	Negative Control
Anticorps anti-Mitochondries (U/mL)	≥50	<7

Si une de ces conditions n'est pas remplie, les résultats sont non valables et le test doit être répété.

Avant de répéter le test, vérifier la procédure suivante.

- Température d'Incubation
- Délai d'Incubation
- Lavage

## ■ INTERPRETATION ET VALEURS ATTENDUES

Les données suivantes sont fournies afin de faciliter l'interprétation. On recommande à chaque laboratoire d'élaborer ses propres critères pour l'interprétation du test basés sur des populations d'échantillons typiques.

anti-Mitochondries (U/mL)	Interprétation
< 7	Négatif pour les anti-Mitochondries M2
Supérieur ou égal à 7	Positif pour les anti-Mitochondries M2

## ■ LIMITATIONS

Comme pour tout test, le résultat obtenu avec le test REAADS Mitochondrie M2 représente une aide au diagnostic et ne doit pas être utilisé par lui-même comme un diagnostic.

## PERFORMANCES

### ■ SPECIFICITE ET SENSIBILITE CLINIQUE

Maladie	Echantillons Positifs	Valeur Positif
CP	111/123	90,2%
HAI I	1/27	3,7%
HAI II	0/4	0,0%
HBV	0/44	0,0%
HCV	2/46	4,3%
Sérum Normal	3/168	1,8%

CBP: Cirrhose Biliaire Primitive

HAI: Hépatite autoimmune

HBV: Hépatite Virale B

HCV: Hépatite Virale C

### ■ PRECISION

La répétabilité a été démontrée en testant 3 échantillons en sextuple. La reproductibilité a été déterminée en testant 3 échantillons à 5 jours différents (jour-à-jour) et en testant 3 échantillons en 3 lots (lot-à-lot). Valeurs %CV pour reproductibilité et répétabilité étaient au-dessous des 15% pour chaque échantillon.

### ■ PORTEE DU TEST

La portée de cette trousse va de 5 U/mL à 300 U/mL.

### ■ INTERFERENCES

L'Hémoglobine (jusque 480 mg/dL), la Bilirubine (jusque 20,0 mg/dL), le chyle (jusque 2780 unités comme Formazine) et/ou le facteur Rheumatoïde (jusque 520 IU/mL) n'influencent pas le résultat du test, mais éviter d'utiliser des échantillons très hémolysés ou lipémiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Berg, P.A. et al: Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. J.Hepatol, 1986, 2 :123
2. Gershwin, M.E. et al: Identification of the mitochondrial enzymes that react with autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. FASEB J., 1988, 2 :2344
3. Leung PS, et al: Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. Hepatology 1995, 22: 505-513
4. Moteki S et al: Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domains for the detection of antimitochondrial autoantibodies. Hepatology 1996, 24: 97-103

## Deutsch

### VERWENDUNGSZWECK

REAADS Mitochondria M2 ist ein semi-quantitativer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Mitochondrialen Autoantikörpern in Humanserum. Der REAADS Mitochondria M2 dient zum Einsatz in-vitro als Hilfestellung bei der diagnostischen die primär biliare Zirrhose.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die primär biliäre Zirrhose (PBC) ist eine 1950 erstmals von Ahrens et al. beschriebene autoimmune Lebererkrankung. Es handelt sich um eine chronische Entzündung der Gallenkapillaren, weshalb der Gallenfluss erschwert ist bzw. die Galle in der Leber staut. Mitochondriale Autoantikörper (AMA) werden so häufig bei Patienten mit einer PBC nachgewiesen, dass sie zu den diagnostischen Kriterien zählen. Nach Berg et al. sind AMA gegen neun, mit M1 bis M9 bezeichnete Antigene, gerichtet, wovon AMA gegen M2 die höchste Spezifität bei PBC besitzen. Einer 1988 erschienenen Veröffentlichung von Gershwin et al. zufolge ist die E2-Komponente der Pyruvat Dehydrogenase (PDC) das wichtigste Hauptantigen der M2-Autoantikörper. Es wurde auch berichtet, dass die Untereinheiten der zum 2-Sauren Dehydrogenase-Komplex zählenden Enzyme (BCOADC-E2, OGDC-E2) auch zu den Antigenen der M2-Autoantikörper gehören. Nach Motegi et al. sind Autoantikörper, die nur gegen jeweils eines dieser Antigene reagieren, in 5-6% der Seren von PBC-Patienten vorhanden.

Der REAADS Mitochondria M2 ist ein sehr sensitiver ELISA zum Nachweis von mitochondrialen Autoantikörpern in Humanserum.

### TESTPRINZIP

Mit REAADS Mitochondria M2 werden mitochondriale Autoantikörper in Serum mittels ELISA bestimmt. Die Kalibratoren, Kontrollseren und Patientenseren werden den mit mitochondrialem M2-Antigen beschichteten Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte hinzugefügt. Im Folgenden reagieren die Autoantikörper mit den Antigenen an der Festphase (Probeninkubation). Nach einem Waschschrift, zur Entfernung nicht gebundener Serumproteine, werden mit Meerrettichperoxidase markierte polyklonale Ziegenantikörper gegen Human-IgG, -IgM und -IgA hinzugefügt. Im Folgenden reagieren sie mit den an der Festphase gebundenen Autoantikörpern (Konjugatinkubation). Nach einem zweiten Waschschrift wird das Peroxidasesubstrat hinzugefügt. Es folgt die Substratinkubation. Dann wird Säure in die Vertiefungen gegeben, um die Enzymreaktion abzustoppen und die Farbentwicklung zu stabilisieren. Anschließend werden die Vertiefungen photometriert und die Ergebnisse in quantitativen berechnend ermittelt.

### KURZFASSUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

	In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte 100 µL verdünnte Probe (1:101) hinzufügen
<Probeninkubation> (20-25°C) 60 Min.	↓ Waschen ↓ In jede Vertiefung 100 µL Konjugat geben
<Konjugatinkubation> (20-25°C) 60 Min.	↓ Waschen ↓ In jede Vertiefung 100 µL Substrat geben
<Substratinkubation> (20-25°C) 30 Min.	↓ In jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben ↓ Photometrieren ↓ Ergebnisse auswerten

## **REAGENZIIEN UND IHRE LAGERUNG**

### **1) MIKROTITERSTREIFEN**

12 Mikrotiterstreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit rekombinantem mitochondrialem M2-Antigen. Die Streifen mit Halterahmen sind in einem Folienbeutel mit Trockenmittel verpackt. Sie sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen können nicht benötigte Streifen im wieder versiegelten Beutel bei 2-8°C für 60 Tage gelagert werden.

### **2) KALIBRATOR 1 (0 U/mL)**

Ein Fläschchen mit 1,5 mL Probendiluent. Enthält 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **3) KALIBRATOR 2 (100 U/mL)**

Zwei Fläschchen mit jeweils 1,5 mL Humanserum positiv für M2-Autoantikörper und mit Probendiluent. Enthält 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **4) KONJUGAT**

Ein Fläschchen (15 mL) mit Meerrettichperoxidase markierten polyklonalen Ziegenantikörpern gegen Human-IgG, -IgA und -IgM (schwere Ketten-spezifisch), HEPES, Proclin 150 und BSA. Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **5) PROBENDILUENT**

Zwei Flaschen (50 mL) mit PBS, Tween 20, Rinderserum und 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig. Bei 2-8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **6) KONZENTRIERTE WASCHLÖSUNG (10X)**

Eine Flasche (100 mL) mit PBS und Tween 20; Konzentrat (10x). Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **7) SUBSTRATLÖSUNG**

Eine Flasche (20 mL) mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid/Wasserstoffperoxid (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **8) STOPPLÖSUNG**

Eine Flasche (20 mL) mit 1 N Schwefelsäure. Gebrauchsfertig. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **9) POSITIVES KONTROLLSERUM**

Ein Fläschchen mit 0,2 mL Humanserum positiv für M2-Autoantikörper. Enthält 0,1% Natriumazid. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **10) NEGATIVES KONTROLLSERUM**

Ein Fläschchen mit 0,2 mL Humanserum negativ für M2-Autoantikörper. Enthält 0,1% Natriumazid. Bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

## **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

- (1) Nur für in-vitro Diagnostik.
- (2) Die Bestandteile eines Testkits nicht über ihr Verfallsdatum hinaus verwenden.
- (3) Berührung der Reagenzien mit Augen, Haut und Bekleidung vermeiden. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser spülen. TMB ist ein Reizmittel und die Stopplösung enthält 1 N Schwefelsäure, einen giftigen und ätzenden Stoff.

- (4) Der Kalibrator 2, die positiven und negativen Kontrollseren sind aus Humanseren hergestellt, die mit negativem Ergebnis auf HBs-Antigen, HCV- sowie HIV 1 und HIV 2-Antikörper untersucht wurden. Indes kann kein Testverfahren gewährleisten, dass diese oder andere infektiöse Erreger nicht vorhanden sind. Diese Reagenzien und alle Patientenproben sollten daher so behandelt werden, als könnten sie AIDS, Hepatitis oder andere Infektionskrankheiten übertragen.
- (5) Die Kalibratoren, die positiven und negativen Kontrollseren und der Probediluent enthalten Natriumazid (0,1%) als Konservierungsstoff. Sie müssen mit Vorsicht behandelt werden. Nicht einnehmen und nicht mit Haut und Schleimhäuten in Berührung bringen. Natriumazid kann mit Kupfer- oder Bleirohren unter Ausbildung explosiver Metallazide reagieren. Falls Natriumazid-haltige Lösungen in den Abguss entsorgt werden, sollte daher mit viel Wasser gespült werden.
- (6) Einige Bestandteile des Kits enthalten Materialien aus nicht-infizierten Tieren. Trotzdem sollten diese Bestandteile als potentiell biogefährlich gehandhabt und entsorgt werden.
- (7) Nur die Mikrotiterstreifen zusammen mit den Kalibratoren aus Kits der gleichen Charge verwenden. Die Reagenzien aus unterschiedlichen Kitschargen nicht gegenseitig austauschen.
- (8) Vor Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.
- (9) Während der Lagerung und Testdurchführung den Kit und seine Reagenzien vor der Sonne schützen.
- (10) Reagenzien und Proben vor Verunreinigung durch Mikroorganismen und gegenseitigen Kontakt schützen.
- (11) Entgegen den Empfehlungen in der Testanleitung veränderte Inkubationstemperaturen (20-25 °C), Inkubationszeiten und Verdünnungen können die Ergebnisse verfälschen.
- (12) Die Vertiefungen müssen sorgfältig mit der Waschlösung gewaschen werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.
- (13) Beim Pipettieren der Proben und Reagenzien Schaumbildung vermeiden, um einer Verschleppung auf benachbarte Vertiefungen vorzubeugen.
- (14) Nicht benötigte Mikrotiterstreifen müssen sofort wieder in den Folienbeutel gelegt und dieser sorgfältig versiegelt werden, damit kein Kondenswasser gebildet wird.
- (15) Das Waschlösungskonzentrat kann bei 2-8 °C trüb werden. Für die Ergebnisse ist das unerheblich.
- (16) Im Test benutzte Gefäße etc. sollten wie folgt behandelt werden:  
1 Stunde in eine Glutaraldehyd-Lösung (2 % Endkonzentration) legen oder länger als 1 Stunde mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (verfügbarer Chlorgehalt ca. 5000 ppm) behandeln oder länger als 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren.
- (17) Die mit diesem Test ermittelten M2-Antikörperspiegel sind nur als Hilfestellung zur Diagnosefindung zu betrachten. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss der Arzt die anamnestische Erhebung, die Befunde der körperlichen Untersuchung und die Daten anderer diagnostischer Verfahren berücksichtigen.

### **BENÖTIGTE, ABER NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN**

- Mikrotiterplatten Reader (Wellenlänge: 450 nm, 620 nm/Referenzfilter)
- Multikanalpipette (100 µL – 300 µL) zum Pipettieren von Konjugat, Substrat und Stopplösung.
- Pipette für 10 µL und 100 µL
- Gefäße für Reagenzien
- Waschgerät oder Spritzflasche
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser

- Messzylinder (1 Liter) zur Herstellung der Waschlösung
- Röhrchen für die Probenverdünnungen (1000 µL)
- Einmal-Pipettenspitzen
- Papierhandtücher
- Schüssel und Desinfektionsmittel
- Klebefolie

## **TESTDURCHFÜHRUNG**

### **■ HERSTELLUNG DER REAGENZIEN**

- Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen.
- Mikrotiterstreifen: Benötigte Streifen dem Folienbeutel entnehmen und im Halterahmen verankern. Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort wieder versiegeln und im Kühlschrank aufbewahren.
- Waschlösungskonzentrat 1:10 verdünnen (z.B. 100 mL Waschlösungskonzentrat in 900 mL Aqua dest. geben). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist 2 Wochen bei 2-8 °C haltbar.
- Die Kalibratoren, das Konjugat, der Probendiluent, das Substrat und die Stopplösung sind alle gebrauchsfertig. Sie dürfen nicht verdünnt werden.

### **■ HERSTELLUNG DER PROBEN UND KONTROLLEN**

- Die Patientenseren sowie die negativen und positiven Kontrollseren 1:101 verdünnen (z.B. 10 µL Serum in 1 mL Probendiluent pipettieren).
  - \*Die verdünnten Seren müssen am selben Tag verwendet werden.
  - \*Ggf. im Probendiluent vorhandene Ablagerungen sind ohne Bedeutung für die Testergebnisse.
- Die Kontrollseren sind wie Patientenseren zu behandeln.
- Wenn möglich, sollten frisch gewonnene Patientenseren verwendet werden. Sie können bis zu einem Monat bei –20 °C oder länger bei –70 °C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
  - \*Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder Lagerung bei –20 °C über einen längeren Zeitraum als 6 Monate kann die Ergebnisse verfälschen, weil IgG in den Proben denaturiert wird.

### **■ TESTABLAUF**

#### **1. SCHRITT (PROBENINKUBATION)**

Von den Kalibratoren, verdünnten Patientenseren, positiven und negativen Kontrollseren jeweils 100 µL in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. (Kalibratoren nicht verdünnen).

\*Das Pipettieren sollte zügig durchgeführt werden, damit sich die Inkubationszeiten für die einzelnen Vertiefungen sich nicht allzu sehr unterscheiden.

Streifen mit Klebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren.

#### **2. SCHRITT (WASCHEN)**

Inhalt in den Vertiefungen absaugen oder auskippen. Mit Waschlösung füllen und vollständig absaugen oder auskippen. Insgesamt viermal waschen. Abschließend Streifen gegen Papierhandtücher ausklopfen, um die letzten Reste an Waschlösung zu entfernen. Bei Einsatz eines automatischen Waschgeräts viermal waschen.

\* Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Waschzeiten und –bedingungen festlegt.

\* Die Waschlösung sollte vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

### 3. SCHRITT (KONJUGATINKUBATION)

Gebrauchsfertige Konjugatlösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µL Konjugat in jede Vertiefung pipettieren. Mit Klebefolie abdecken und 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.

### 4. SCHRITT (WASCHEN)

Die Streifen wie im 2. SCHRITT beschrieben waschen.

### 5. SCHRITT (SUBSTRATINKUBATION)

Substratlösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µL in jede Vertiefung pipettieren.

\*Nicht die selbe Wanne wie jene für das Konjugat verwenden. Am besten eignet sich eine neue Einwegwanne, weil das Substrat leicht durch Metallionen oxidiert wird.

\*Ggf. in der Wanne übrig gebliebenes Substrat darf nicht in die Substratflasche zurückgeführt werden.

Mit Klebefolie abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.

### 6. SCHRITT (ABSTOPPEN)

Die Stopplösung in eine Wanne geben. Mit einer Multikanalpipette 100 µL in jede Vertiefung pipettieren.

## ■ PHOTOMETRIEREN

Die Extinktion jeder Vertiefung bei 450 nm messen. Bei Verwendung eines Photometers mit zwei Wellenlängen erfolgt die Extinktionsmessung bei 450 nm, die Referenzmessung bei 620 nm.

\*Die Vertiefungen sollten sofort nach dem Abstoppen photometriert werden.

\*Die Unterseite der Streifen muss sauber und trocken sein. Die Vertiefungen dürfen beim Photometrieren keine Luftblasen enthalten.

## ■ BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

$$\text{Arbiträre Einheiten} = \frac{A_{450}\langle\text{Probe}\rangle - A_{450}\langle\text{Kalibrator 1}\rangle}{(A_{450}\langle\text{Kalibrator 2}\rangle - A_{450}\langle\text{Kalibrator 1}\rangle)} \times 100$$

\* $A_{450}$  bedeutet: Extinktion bei 450 nm

\*Da eine internationale Referenzpräparation für Mitochondriale-Autoantikörper nicht verfügbar ist, ist der Test in relativen arbiträren Einheiten kalibriert.

## ■ QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testansatz müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

$A_{450}$  vom Kalibrator 1:  $\leq 0,150$

$A_{450}$  vom Kalibrator 2:  $\geq 0,700$

Die positiven und negativen Kontrollseren müssen folgende Ergebnisse zeigen:

	Positivkontrolle	Negativkontrolle
M2-Autoantikörper (U/mL)	$\geq 50$	$< 7$

Wird einer dieser Werte nicht erreicht, sind die Ergebnisse ungültig. Der Testlauf sollte wiederholt werden. Ehe der Testlauf wiederholt wird, sind folgende Parameter der Testdurchführung zu überprüfen:

- Inkubationstemperatur
- Inkubationszeiten
- Waschverfahren

## **BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE UND ERWARTETE WERTE**

Die folgenden Daten dienen nur der Orientierung. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Grenzwerte auf der Grundlage der von ihm betreuten Patientenpopulationen erstellt.

M2-Autoantikörper (U/mL)	Beurteilung
< 7	Negativ für M2-Ak
≥ 7	Positiv für M2-Ak

### ■ **GRENZEN DES VERFAHRENS**

Wie bei anderen diagnostischen Verfahren, so sind die mit REAADS Mitochondria M2 ermittelten Ergebnisse nur eine Hilfestellung bei der Diagnostik und nicht diagnostisch an sich zu werten.

## **LEISTUNGSMERKMALE**

### ■ **KLINISCHE SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT**

Erkrankung	Positive Proben	Positivrate
PBC	111/123	90,2%
AIH I	1/27	3,7%
AIH II	0/4	0%
HBV	0/44	0%
HCV	2/46	4,3%
Normalkollektiv	3/168	1,8%

PBC: Primär biliäre Zirrhose

AIH: Autoimmunhepatitis

HBV: Hepatitis B-Virus

HCV: Hepatitis C-Virus

### ■ **PRÄZISION (IN DER SERIE)**

Bei 3 verschiedenen Proben, die mehr als 8mal in einem Ansatz getestet wurden, lag der VK jeder einzelnen Probe unter 15 %.

### ■ **MESSBEREICH**

Der Messbereich dieses Kits erstreckt sich von 5 U/mL bis 300 U/mL.

### ■ **INTERFERENZEN**

Hämoglobin (bis 480 mg/dL), Bilirubin (bis 20,0 mg/dL), Chylus (bis 2.780 Formazin-Einheiten) und / oder Rheumafaktoren (bis 520 IU/mL) beeinträchtigen die Testergebnisse nicht. Stark hämolytische und stark lipämische Proben sollten aber vermieden werden.

## **LITERATUR**

1. Berg,P.A. et al:Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. J.Hepatol, 1986, 2 :123
2. Gershwin,M.E. et al:Identification of the mitochondrial enzymes that react with autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. FASEB J., 1988, 2 :2344
3. Leung PS, et al:Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. Hepatology 1995, 22: 505-513
4. Moteki S et al:Use of a designer triple expression hybrid clone for three diferent lipoyl domains for the detection of antimitchondorial autoantibodies. Hepatology 1996, 24: 97-103

## Español

### **INDICACIONES**

La prueba para anticuerpos antimitocondriales M2 de MESACUP es un procedimiento inmunoenzimático (ELISA) para la detección de autoanticuerpos específicos contra antígeno mitocondrial M2 en suero humano. La prueba para anticuerpos antimitocondriales M2 de MESACUP es para uso diagnóstico in vitro como ayuda en la determinación la cirrosis biliar primaria.

### **RESUMEN Y EXPLICACIÓN**

La cirrosis biliar primaria (CBP) es una enfermedad hepática autoinmune identificada en 1950 por Ahrens et al, que se caracteriza por la inflamación crónica de los conductos biliares de mediano calibre, lo cual dificulta el paso de la bilis causando su permanencia en el hígado. Los anticuerpos antimitocondriales ocurren con frecuencia en pacientes con CBP y su presencia constituye uno de los criterios diagnósticos de esta enfermedad. Berg et al clasificaron los antígenos mitocondriales de M1 a M9, y determinaron que los anticuerpos contra el antígeno M2 son los más específicos para la CBP. En 1988, Gershwin et al. reportaron que el antígeno principal M2 es el componente E2 del complejo deshidrogenasa pirúvica. Además, se ha reportado que la subunidad (BCOADC-E2, OGDC-E2) de la enzima que pertenece al complejo deshidrogenasa ácida-2 también corresponde al antígeno de los anticuerpos anti-M2. Según reportes de Motegi et al, los anticuerpos que reaccionan solamente contra uno de esos antígenos se encuentran en aproximadamente del 5% al 6 % de los pacientes con CBP.

La prueba para anticuerpos antimitocondriales M2 de MESACUP utiliza la tecnología de alta sensibilidad de ELISA para medir estos autoanticuerpos en suero.

### **FUNDAMENTO**

La prueba para anticuerpos antimitocondriales M2 de MESACUP utiliza la tecnología de alta sensibilidad de ELISA para medir autoanticuerpos específicos contra M2 en suero. Se añaden calibradores y suero a pocillos revestidos con antígenos a fin de que los anticuerpos antimitocondriales reaccionen con los antígenos inmobilizados (incubación de las muestras). Después del lavado para remover cualquier proteína sérica libre, se añaden e incuban anticuerpos anti-inmunoglobulina IgG, IgA e IgM humana conjugados con enzima peroxidasa (incubación del conjugado). Luego de otro lavado se añade sustrato de peroxidasa (incubación del sustrato). Finalmente, se le añade una solución ácida a cada pocillo para detener la reacción enzimática y estabilizar el color. Los resultados se cuantifican y calculan mediante la medición fotométrica de la reacción.

### **RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO**

	Añadir 100 µL de muestra diluida (1:101) a cada pocillo de la placa
<Incubación: Muestra> (20-25°C) 60 min.	↓ Lavado ↓
	Añadir 100 µL de solución del conjugado a cada pocillo
<Incubación: Conjugado> (20-25°C) 60 min.	↓ Lavado ↓
	Añadir 100 µL de sustrato a cada pocillo
<Incubación: Sustrato> (20-25°C) 30 min.	↓ Añadir 100 µL de la solución de parada a cada pocillo ↓ Lectura de la absorbancia ↓
	Interpretación de los resultados

## **REACTIVOS Y ALMACENAJE**

### **1) TIRAS DE MICROPOCILLOS**

TIRAS DE MICROPOCILLOS (12 x 8 pocillos) revestidos con antígenos producidos mezclando proteínas recombinantes purificadas. Las tiras desprendibles vienen en un sujetador, y están envasadas y selladas en un sobre de aluminio con material desecante, que las mantiene estables a temperaturas entre 2 y 8° C hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta.

### **2) CALIBRADOR 1 (0 U/mL)**

Un vial con 1.5 mL de Diluyente de la Prueba, que contiene azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **3) CALIBRADOR 2 (100 U/mL)**

Dos viales con 1.5 mL de suero humano para control positivo de anticuerpos antimitocondriales con Diluyente de la Prueba, que contiene azida de sodio al 0.1%. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **4) REACTIVO DEL CONJUGADO**

Un vial con 15 mL de anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM humanos conjugados con enzima peroxidasa (específicos para cadena pesada), HEPES, Proclin 150 y BSA. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **5) DILUYENTE DE LA PRUEBA**

Dos frascos con 50 mL de PBS, Tween-20, azida de sodio al 0.1%. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **6) CONCENTRADO PARA EL LAVADO (10X)**

Un frasco con 100 mL de PBS y Tween 20 concentrado a 10X. Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **7) SOLUCIÓN DEL SUBSTRATO**

Un frasco de 20 mL con dihidrocloridato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina/peróxido de hidrógeno (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Listo para usar. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **8) SOLUCIÓN DE PARADA**

Un frasco de 20 ml con ácido sulfúrico a 1N. Listo para usar. Estable entre 2 y 8°C hasta su fecha de vencimiento.

### **9) SUERO HUMANO PARA CONTROL POSITIVO**

Un vial con 0.2 mL de suero humano para control positivo de anticuerpos antimitocondriales con azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

### **10) SUERO HUMANO PARA CONTROL NEGATIVO**

Un vial con 0.2 mL de suero humano para control negativo de anticuerpos antimitocondriales con azida de sodio al 0.1%. Estable entre 2 y 8° C hasta su fecha de vencimiento.

## **PRECAUCIONES**

- (1) Este producto es sólo para uso diagnóstico in vitro.
- (2) No use los componentes de la prueba después de sus fechas de vencimiento.
- (3) Evite el contacto de los reactivos con los ojos, piel y vestimenta. Si los reactivos entran en contacto con la piel, enjuáguese con abundante agua. El TMB contiene irritantes, mientras que la Solución de Parada consiste en ácido sulfúrico al 1N, que es venenoso y corrosivo.
- (4) El Calibrador 2 y los Controles positivo y negativo contienen suero humano en los cuales no se han detectado antígenos HB, HCV, HIV-1 y HIV-2. Sin embargo, ninguna prueba puede garantizar la ausencia de estos y otros agentes infecciosos. Estos reactivos, así como todas las muestras de pacientes, deben manipularse como material capaz de transmitir el SIDA, la hepatitis o cualquier otra enfermedad infecciosa.

- (5) El Calibrador 1, el Calibrador 2, el Control Positivo, el Control Negativo y el Diluyente de la Prueba contienen azida de sodio (0.1%) como preservante y deben manipularse con precaución: no ingerir o permita que entren en contacto con la piel o membranas mucosas. La azida de sodio puede reaccionar con el cobre o el plomo de los tubos de gasfitería y formar azidas metálicas explosivas. Por lo tanto, al verter por el desagüe los materiales que contienen azidas, siempre enjuague con abundante agua.
- (6) Algunos componentes de la prueba contienen materiales de origen animal. Aunque provienen de animales sin posibilidades de infectar, se deben usar y desechar estos componentes como si fueran capaces de infectar.
- (7) Use las Tiras de Micropocillos, el Conjugado y el Calibrador 2 con sus números de lote correspondientes. No sustituya con reactivos de otros lotes.
- (8) Deje que todos los reactivos adquieran temperatura ambiente (20-25°C) antes de empezar la prueba.
- (9) No exponga los componentes a luz solar directa durante su almacenaje o durante la prueba.
- (10) Evite la contaminación microbiana o cruzada entre los reactivos y muestras.
- (11) Las temperaturas de incubación fuera del rango de la temperatura ambiente normal (20-25°C), los períodos de incubación más cortos o prolongados, y las diluciones inexactas podrían producir resultados erróneos.
- (12) Los pocillos deben enjuagarse con la Solución de Lavado adecuadamente para evitar falsos positivos.
- (13) Use las pipetas con cuidado para evitar que las muestras o los reactivos formen espuma y causen contaminación cruzada en los pocillos.
- (14) Coloque todas las tiras desprendibles que no se usen inmediatamente dentro de la bolsa cerrándola herméticamente para evitar la absorción de humedad.
- (15) El Concentrado de Lavado podría volverse turbio a temperaturas entre 2 y 8°C. Sin embargo, esto no va a producir resultados inconsistentes.
- (16) Los instrumentos usados para la prueba se deben desechar o ser tratados de una de las siguientes maneras:  
Remojar en una solución de glutaraldehído a una concentración final del 2% por más de una hora; remojar en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (cloro disponible: aproximadamente 5000 ppm) por más de una hora; o colocar en el autoclave a 121 °C por más de 20 minutos.
- (17) El valor que se obtengan con esta prueba para anticuerpos antimitocondriales M2 sirven sólo de ayuda en el diagnóstico. El médico debe interpretar estos resultados conjuntamente con la historia del paciente, la evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos.

### **MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS**

- Lectora para microplacas (longitud de onda: 450 nm, 620 nm/referencia)
- Micropipeta multicanal (p.ej. 100 µL - 300 µL) para dispensar el conjugado, el substrato y la solución de parada.
- Micropipeta unicanal (10 µL y 100 µL)
- Reservorio para reactivos
- Botella para lavado o instrumento para lavado automático
- Agua destilada o deionizada
- Probeta graduada de un litro para la preparación de la solución de lavado
- Microtubos para las diluciones de las muestras de los pacientes (p.ej. 1000 µL)
- Puntas de pipeta desechables
- Toallas de papel
- Recipiente y desinfectante
- Cubierta de placa

## **PROCEDIMIENTO**

### **■ PREPARACIÓN DEL LOS REACTIVOS**

- Deje que todos los materiales adquieran temperatura ambiente (20-25 °C) antes de empezar la prueba.
- Tiras de Micropocillos: Desprenda el número de tiras requerido de su envase y colóquelas en el sujetador. Inmediatamente guarde y refrigere todas las tiras que no vaya a usar.
- Solución de Lavado: Prepare una dilución de 1:10 con el Concentrado de Lavado (p.ej. añada 100 mL del Concentrado de Lavado a 900 mL de agua destilada). Esta dilución se mantendrá estable durante 2 semanas a temperaturas entre 2 y 8 °C.
- No diluya el Calibrador 1, el Calibrador 2, el Diluyente de la Prueba, el Substrato ni la Solución de Parada, ya que vienen listos para usar.

### **■ PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS/CONTROLES**

- Diluya cada suero, el Control Positivo y el Control Negativo al 1:101 añadiendo 10 µL de suero a 1 mL de Diluyente de la Prueba.
  - \*Las muestras diluidas se deben usar el mismo día de la prueba.
  - \*El Diluyente de la Prueba podría formar un precipitado, pero esto no produce resultados inconsistentes.
- Los controles se deben tratar igual que al suero.
- Use muestras frescas de suero. Si requieren almacenaje, deben congelarse a -20 °C hasta un máximo de un mes; o a -70 °C por períodos más prolongados. Evite congelar y descongelar repetidas veces.
- Si se almacenen las muestras a -20 °C por más de 6 meses, o se congelan y descongelan repetidas veces, podrían obtenerse resultados inespecíficos debido a la desnaturalización del IgG.

### **■ PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

#### **PASO 1. (INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS)**

Con la pipeta multicanal, transfiera 100µL de cada muestra diluida, así como los Controles Positivo y Negativo, dentro de los pocillos correspondientes sobre la placa. Añada los Calibradores directamente a los pocillos, ya que no es necesario diluirlos.

\*La incubación empieza desde el momento en que se transfieren las muestras a los pocillos, por lo que la transferencia con las pipetas se debe completar lo más rápidamente posible.

Cubra los pocillos con la cubierta de placa e incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

#### **PASO 2. (LAVADO)**

Aspire o deseche el contenido de los pocillos. Llene cada pocillo con la Solución de Lavado, y luego aspire o deseche todo su contenido. Repita el lavado 4 veces. Golpee la placa sobre una toalla de papel a fin de que absorba cualquier resto de la Solución de Lavado. Si usa un instrumento de lavado automático, repita el lavado 4 veces.

\* Se recomienda que cada laboratorio confirme sus propios tiempos y procedimientos de lavado.

\* La Solución del Lavado se debe usar a temperaturas entre 20 y 25 °C.

#### **PASO 3. (INCUBACIÓN DEL CONJUGADO)**

Vierta el Reactivo del Conjugado dentro de un reservorio. Añada 100 µL de Reactivo del Conjugado a cada pocillo usando una pipeta multicanal. Cubra los pocillos con la cubierta de placa e incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

#### **PASO 4. (LAVADO)**

Lave la microplaca siguiendo el procedimiento del PASO 2.

#### **PASO 5. (INCUBACIÓN DEL SUBSTRATO)**

Vierta el Substrato dentro de un reservorio y transfiera 100 µL de Substrato a cada pocillo usando una pipeta multicanal.

\*El reservorio debe ser diferente del que se usó para verter la solución del conjugado. Debe usarse un reservorio nuevo desechable, ya que el Substrato es fácilmente oxidizado por iones metálicos.

\*Una vez que se vierta el Substrato en el reservorio, no debe regresarse a su frasco original.

Cubra los pocillos con la cubierta de placa e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

#### **PASO 6. (REACCIÓN DE PARADA)**

Vierta la Solución de Parado dentro de un reservorio. Transfiera 100 µL de la solución a cada pocillo usando una pipeta multicanal.

#### ■ **LECTURA**

Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm. Si se dispone de una lectora de placa de longitud de onda doble, coloque la longitud de onda a 450 nm y la referencia 620 nm.

\* La lectura se debe realizar lo más rápidamente posible después de detener la reacción.

\* Antes de leer la placa, verifique que la parte inferior esté limpia y seca, y que la superficie del líquido dentro de los pocillos esté libre de burbujas.

#### ■ **CÁLCULO DEL RESULTADO**

$$\text{Valor (U/mL)} = \frac{(A_{450} < \text{Muestra} > - A_{450} < \text{Calibrador 1} >)}{(A_{450} < \text{Calibrador 2} > - A_{450} < \text{Calibrador 1} >)} \times 100$$

\*  $A_{450}$  es el valor de absorbancia a 450 nm.

\* No se dispone de material internacional de referencia apropiado para la medición de anticuerpos antinucleares mediante ELISA; la prueba está calibrada en unidades relativas arbitrarias.

#### ■ **CONTROL DE CALIDAD**

Cada prueba debe cumplir con los siguientes criterios:

$A_{450}$  del Calibrador 1:  $\leq 0.150$

$A_{450}$  del Calibrador 2:  $\geq 0.700$

Los Controles Positivo y Negativo deben dar los siguientes resultados:

	Control Positivo	Control Negativo
Valor Anticuerpo Antimitocondrial (U/mL)	$\geq 50$	$< 7$

Si no se cumple alguno, los resultados son inválidos y se debe repetir la prueba.

Antes de revisar la prueba, revise los siguientes procedimientos.

- Temperatura de incubación
- Tiempo de incubación
- Lavado

#### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y VALORES ESPERADOS**

El propósito del siguiente cuadro sirve sólo como guía para la interpretación. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios criterios para la interpretación de resultados de acuerdo a sus poblaciones típicas.

Valor anticuerpo antimitocondrial (U/mL)	Interpretación
< 7	Negativo para anticuerpos antimitocondriales
Mayor o igual a 7	Positivo para anticuerpos antimitocondriales

## ■ LIMITACIONES

Al igual que otros procedimientos, los resultados que se obtengan con la prueba para anticuerpos antimitocondriales M2 de MESACUP sirven sólo de ayuda en el diagnóstico y no deben ser interpretados por sí solos como diagnósticos.

## CARACTERÍSTICAS DE LA PRUEBA

### ■ ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

Enfermedad	Muestras positivas/Total	% de positividad
CBP	111/123	90.2%
AIH I	1/27	3.7%
AIH II	0/4	0.0%
HBV	0/44	0.0%
HCV	2/46	4.3%
Suero normal	3/168	1.8%

CBP: Cirrosis biliar primaria

AIH: Hepatitis autoinmune

HBV: Virus de la Hepatitis B

HCV: Virus de la Hepatitis C

### ■ PRECISIÓN

Se demostró la precisión analizando 3 muestras en sextuplicado. Se determinó la reproducibilidad analizando 3 muestras en 5 días distintos (día a día) y analizando 3 muestras de 3 lotes (lote a lote). Los valores del Coeficiente de Variación (CV) para precisión y reproducibilidad estuvieron debajo del 15% para cada muestra.

### ■ RANGO DE LA PRUEBA

El rango de esta prueba es de 5 U/mL a 300 U/mL.

### ■ SUSTANCIAS INTERFERENTES

La hemoglobina (hasta 480 mg/dL), la bilirrubina (hasta 20.0 mg/dL), el quilo (hasta 2,780 unidades, de Formazine) y/o el factor reumatoideo (hasta 520 IU/mL) no afectan el resultado de la prueba. Sin embargo, evite usar muestras con niveles altos de hemólisis o lipemia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Berg,P.A. et al: Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. J.Hepatol, 1986, 2 :123
2. Gershwin,M.E. et al: Identification of the mitochondrial enzymes that react with autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. FASEB J., 1988, 2 :2344
3. Leung PS, et al: Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. Hepatology 1995, 22: 505-513
4. Moteki S et al: Use of a designer triple expression hybrid clone for three diferent lipoyl domains for the detection of antimitochondrial autoantibodies. Hepatology 1996, 24: 97-103

## Italiano

### **USO PREVISTO**

REAADS Mitochondria M2 è un dosaggio immunoenzimatico semi-quantitativo (ELISA) per il rilevamento degli anticorpi anti-Mitocondrio nel siero umano.

REAADS Mitochondria M2 è previsto per uso diagnostico in vitro come aiuto nella determinazione di cirrosi biliare primaria.

### **RIASSUNTO E SPIEGAZIONE**

La Cirrosi Primitiva Biliare (PBC) è una malattia cronica, idiopatica e autoimmune del fegato, descritta nel 1950 da Ahrens ed altri, caratterizzata dalla specifica distruzione e obliterazione dei dotti biliari intraepatici. Il sintomo sierologico più importante di questa malattia è la produzione di anticorpi anti-Mitocondrio (AMA). Tali anticorpi reagiscono con diversi antigeni all'interno dei mitocondri, chiamati M1-M9; secondo Berg et al., M2 è il marker specifico per la diagnosi sierologica di PBC. Nel 1988 Gershwin et al riportarono che il principale antigene M2 coincide con la componente E2 del complesso piruvato deidrogenasi (PDC). E' stato inoltre riportato che subunità (BCOADC-E2,OGDC-E2) che appartengono al complesso 2-acid dehydrogenase sono anch'essi antigene specifico per anticorpi M2 e Motegi ed altri hanno riportato che anticorpi che reagiscono con solo una di queste proteine è presente approssimativamente nel 5-6% dei pazienti con PBC.

REAADS MITOCHONDRIA M2 è un test in ELISA con alta sensibilità per la ricerca di anticorpi anti-Mitocondrio nel siero. 5-6 % of sera from patient with PBC.

### **PRINCIPIO**

REAADS Mitochondria M2 misura anticorpi presenti nel siero per ELISA. Calibratori, Controlli e sieri dei pazienti sono aggiunti ai pozzetti sensibilizzati con antigeni mitocondriali M2, consentendo agli anticorpi anti-Mitocondrio di reagire con l'antigene immobilizzato (Incubazione del campione).

Dopo i lavaggi per rimuovere proteine sieriche non legate, viene aggiunto un anticorpo anti IgG, IgA ed IgM umane coniugato con horseradish perossidasi e si procede a nuova incubazione (Incubazione del Coniugato).

Dopo ulteriori lavaggi viene aggiunto il substrato per l'enzima perossidasi ed incubato ulteriormente (Incubazione del Substrato).

Una soluzione acida è quindi aggiunta ad ogni pozzetto per stoppare la reazione enzimatica e stabilizzare lo sviluppo del colore.

Il test può fornire dati quantitativi misurando la reazione fotometrica e riportando su calcolatore i risultati.

### **BREVE DESCRIZIONE DEL METODO**

	Aggiungere 100µL di campione diluito (1:101) ad ogni pozzetto della piastra microtiter.
<Incubazione del Campione> (20-25°C) 60 min.	↓ Lavare ↓
	Aggiungere 100µL di Coniugato ad ogni pozzetto.
<Incubazione del Coniugato> (20-25°C) 60 min.	↓ Lavare ↓
	Aggiungere 100µL di Substrato ad ogni pozzetto.
<Incubazione del Substrato> (20-25°C) 30 min.	↓ Aggiungere 100µL di Sol. bloccante ad ogni pozzetto. ↓ Leggere l'assorbanza ↓ Interpretare il risultato

## **REAGENTI E LORO CONSERVAZIONE**

### **1) STRIPS DI POZZETTI MICROTITER**

96 Pozzetti di piastre microtiter in Strips (12 x 8 pozzetti) coatati con antigene purificati da proteine ricombinanti. Le strips frazionabili, contenute in un apposito alloggiamento e confezionate in busta di alluminio con materiale desiccante, sono stabili a 2-8°C.

Le strips mantengono la loro stabilità per 60 giorni se conservate a 2-8°C una volta aperta e correttamente richiusa la busta.

### **2) CALIBRATORE 1 (0 U/mL)**

Due flaconi contenenti 1.5mL di siero umano normale con Diluente del test, contenente sodiazide 0.1%. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **3) CALIBRATORE 2 (100 U/mL)**

Due flaconi contenenti 1.5 mL di siero umano positivo per gli anticorpi anti Mitocondrio con Diluente del test, contenente sodiazide 0.1%. Pronto all'uso. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **4) CONIUGATO**

Un flacone contenente 15 mL di anticorpo in capra anti immunoglobuline umane IgG, IgA ed IgM (specifico per catene pesanti) coniugato con horseradish perossidasi HEPES, Proclin 150 and BSA, Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **5) DILUENTE DEL TEST**

Un flacone contenente 50 mL di tampone Tris, albumina da siero bovino e 0.1% sodioazide. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **6) SOLUZIONE CONCENTRATA DI LAVAGGIO (10x)**

Un flacone contenente 100 mL di PBS e Tween 20, concentrato 10x. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **7) SUBSTRATO**

Un flacone contenente 20 mL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride /hydrogen peroxide (TMB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **8) SOLUZIONE BLOCCANTE**

Un flacone contenente 20 mL di 1.0N acido solforico. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **9) SIERO DI CONTROLLO POSITIVO**

Un flacone contenente 0.2 mL di siero umano positivo per gli anticorpi anti-Mitocondrio Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

### **10) SIERO DI CONTROLLO NEGATIVO**

Un flacone contenente 0.2 mL di siero umano negativo per gli anticorpi anti-Mitocondrio con 0.1% sodioazide. Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.

## **PRECAUZIONI PER L'USO**

- (1) Questo prodotto è per solo uso diagnostico in vitro.
- (2) Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza riportata per ognuno.
- (3) Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi, la pelle e gli indumenti. Se i reagenti vengono a contatto con la pelle, lavare immediatamente con acqua in abbondanza. TMB contiene sostanze irritanti e la Soluzione bloccante è composta da acido solforico 1N, velenoso e corrosivo.

- (4) Calibratore 2, Controllo Positivo e Controllo Negativo derivano da siero umano negativo per l'antigene HBs, gli anticorpi HIV (HIV-1 ed HIV-2) e gli anticorpi anti HCV. Peraltro nessun test può garantire in maniera certa l'assenza di questi od altri agenti infettivi, dunque i reagenti e tutti i campioni dei pazienti devono essere trattati come potenzialmente capaci di trasmettere malattie infettive note (AIDS, HCV etc) o sconosciute.
- (5) Calibratore 1, Calibratore 2, Controllo Positivo, Controllo Negativo e Diluente del test contengono come conservante, 0.1% sodio azide, dunque essi devono essere maneggiati con cura (non ingerire o far venire a contatto con mucose o pelle). La sodioazide può reagire con rame o piombo per formare azidi metalliche esplosive. Quindi, diluire con abbondante acqua prima di smaltire.
- (6) Alcune componenti dei kits contengono materiali di origine animale, derivanti da animali non infetti. Queste componenti dovrebbero essere trattate come pericolose per la salute sia al momento dell'uso che a quello dello smaltimento.
- (7) Per effettuare il test devono essere usati componenti (Strips di pozzetti, Coniugato e Calibratore 2) contrassegnati dallo stesso numero di lotto. Non sostituire singoli reagenti con reagenti provenienti da altri kits.
- (8) Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima di iniziare il test.
- (9) Non esporre il kit alla diretta luce del sole durante l'esecuzione del test e la conservazione.
- (10) Evitare inquinamento batterico e cross contaminazione dei reagenti o dei campioni.
- (11) Tempi di incubazione al di sopra o al di sotto della temperatura ambiente (20-25°C), periodi di incubazione più brevi o lunghi e non precise diluizioni possono dare comportare errori nei risultati.
- (12) I pozzetti devono essere lavati con Soluzione di Lavaggio accuratamente per evitare false positività.
- (13) Pipettare accuratamente senza provocare schiuma ogni campione e reagente per evitare cross contaminazione da pozzetto a pozzetto.
- (14) Se non immediatamente richiesto, tutte le strips devono essere riposte nella busta ed accuratamente sigillate per evitare assorbimento di umidità.
- (15) La Soluzione concentrata di Lavaggio può divenire torbida a 2-8°C, ma questo non causa danni al test.
- (16) Materiali impiegati per il test devono essere trattati come segue:  
Bagnare in soluzione 2% Glutaraldeide per più di 1 ora  
o in soluzione 0.5% Sodio Ipcloclorito per più di 1 ora  
o autoclavare a 121°C per più di 20 minuti.
- (17) Il valore di anticorpi anti Mitocondrio ottenuto da questo test è solo un aiuto per la diagnosi. Ogni medico deve interpretare i risultati alla luce della storia clinica del paziente, delle osservazioni e di ogni altra indagine diagnostica.

### **MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda : 450nm, 620 nm/riferimento)
- Micropipetta multicanale (100µL – 300µL)
- Micropipetta a singolo canale (10µL & 100µL)
- Flaconi per reagenti
- Lavatore automatico o bottiglia per lavaggio
- Acqua deionizzata o distillata
- Cilindri graduati da 1 litro per la preparazione della Soluzione di Lavaggio
- Provette per la diluizione dei campioni dei pazienti (1000µL)

- Puntali usa e getta per la micropipette
- Carta
- Catinella e disinfettante
- Coperchio per piastra microtiter

## **PROCEDURA**

### **■ PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

- Prima dell'uso portare tutti i materiali necessari al test a temperatura ambiente (20-25 °C).
- Strips di micropozzetti: Rimuovere i pozzetti richiesti e piazzarli in apposito alloggio. Riporre prontamente nella busta le strips non richieste per la corretta conservazione refrigerata.
- Soluzione di Lavaggio: La Soluzione concentrata deve essere diluita prima dell'uso 1:10 aggiungendo 100ml di Soluzione concentrata a 900 mL di acqua distillata. La Soluzione diluita è stabile per 2 settimane a 2-8 °C.
- Non diluire Calibratore 1 e 2, Coniugato, diluente del test, Substrato e Soluzione bloccante che sono pronti all'uso.

### **■ PREPARAZIONE DEI CAMPIONI/CONTROLLI**

- Diluire ogni siero di paziente 1: 101 aggiungendo 10µL di siero a 1mL Diluente del Test.  
\*I campioni diluiti devono essere usati entro un giorno.  
\*Il diluente del test può formare precipitati che non influiscono sui risultati
- I controlli devono essere trattati allo stesso modo dei sieri dei pazienti.
- Usare sieri freschi di paziente. Se vi è necessità di conservazione, i sieri possono essere aliquotati e conservati congelati a -20°C per un mese, a -70°C per più lunghi periodi. Non ripetere congelamenti e scongelamenti.  
\*In caso di conservazione a -20°C per più di 6 mesi o ripetuti congelamenti e scongelamenti, risultati non specifici possono essere ottenuti in conseguenza di denaturazione delle IgG.

### **■ PROCEDURA DEL TEST**

#### **FASE 1. (INCUBAZIONE DEL CAMPIONE)**

Pipettare con pipetta multicanale 100µL di ognuno dei campioni diluiti, dei Controlli Positivo e Negativo in pozzetti di piastre microtiter. Aggiungere i Calibratori direttamente negli appositi pozzetti. (Non diluire i Calibratori).

\*L'incubazione inizia quando il campione viene pipettato nel pozzetto. L'operazione deve essere completata nel più breve tempo possibile.

Coprire i pozzetti con un coperchio adesivo ed incubare a temperatura ambiente (20-25 °C) per 60 minuti.

#### **FASE 2. (LAVAGGIO)**

Aspirare o scartare il contenuto dei pozzetti. Riempire ogni pozzetto con Soluzione di Lavaggio, quindi aspirare completamente o scartare il contenuto. Ripetere questa operazione di lavaggio 4 volte. Sbattere la micropiastra su un pezzo di carta per rimuovere ogni residuo di Soluzione di Lavaggio. Quando viene usato un lavatore automatico, lavare 4 volte.

\* Si raccomanda di stabilire per ogni laboratorio gli appropriati tempi di lavaggio e le altre condizioni.

\* La Soluzione di Lavaggio deve essere usata a 20-25 °C.

#### **FASE 3. (INCUBAZIONE DEL CONIUGATO)**

Versare la Soluzione di Coniugato in un flacone. Aggiungere 100µL del Coniugato ad ogni pozzetto con micropipetta multicanale. Coprire i pozzetti con un coperchio sigillante ed incubare a temperatura ambiente (20-25 °C) per 60 minuti.

#### FASE 4. (LAVAGGIO)

Lavare la micropiastra come nella Fase 2 precedentemente descritta.

#### FASE 5. (INCUBAZIONE DEL SUBSTRATO)

Versare il Substrato in un flacone. Aggiungere 100µL del Substrato ad ogni pozzetto con micropipetta multicanale.

\*Questo flacone deve essere diverso da quello usato per la Soluzione di Coniugato.

\*Un nuovo flacone usa e getta deve essere usato, dato che il substrato tende facilmente ad essere ossidato da ioni metallo.

Coprire i pozzetti con un coperchio adesivo ed incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per 30 minuti.

#### FASE 6. (REAZIONE BLOCCANTE)

Versare Soluzione Bloccante in un flacone. Aggiungere 100µL della soluzione ad ogni pozzetto con una micropipetta multicanale.

#### ■ LETTURA

Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450nm.

Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, regolare la lunghezza d'onda per il test a 450nm ed il riferimento a 620nm.

\*La lettura deve essere fatta prima possibile una volta bloccata la reazione.

\*Prima della lettura della micropiastra, assicurarsi che il fondo della stessa sia pulito ed asciutto, e che non siano presenti sulla superficie del liquido contenuto nei pozzetti bolle d'aria.

#### ■ CALCOLO DEI RISULTATI

$$\text{Val.Unità (U/mL)} = \frac{(A_{450}<\text{Campione}> - A_{450}<\text{Calibratore 1}>)}{(A_{450}<\text{Calibratore 2}> - A_{450}<\text{Calibratore 1}>)} \times 100$$

\*A<sub>450</sub> è l'abbreviazione del valore di assorbanza a 450 nm.

\*Uno standard internazionale di riferimento per gli anticorpi anti-Mitocondrio non è disponibile. Il test è calibrato in unità arbitrarie.

#### ■ CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni dosaggio dovrebbe rispondere ai seguenti criteri.

A<sub>450</sub> del Calibratore 1: ≤0.150

A<sub>450</sub> del Calibratore 2: ≥0.700

I Controlli Positivo e Negativo devono dare i seguenti risultati:

	Controllo Positivo	Controllo Negativo
anti-Mitocondrio val.(U/mL)	≥50	< 7

Se qualcuno di questi criteri non è rispettato, i risultati non sono validi ed il test deve essere ripetuto. Prima di ripetere il test, verificare i seguenti passaggi.

- Temperatura di Incubazione
- Tempo di Incubazione
- Lavaggi

## **INTERPRETAZIONE DEL TEST E VALORI ATTESI**

Quanto segue è inteso solo come guida per l'interpretazione. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri criteri per l'interpretazione del test, basati sulla popolazione generalmente analizzata.

Anticorpi anti-Mitocondrio (U/ml)	<u>Interpretazione</u>
< 7	Negativo per anticorpi anti-Mitocondrio M2
Maggiore o uguale a 7	Positivo per anticorpi anti-Mitocondrio M2

### ■ **LIMITAZIONI**

Come con le altre procedure diagnostiche, i risultati ottenuti con REAADS Mitochondria M2 servono solo come aiuto nella diagnosi e non dovrebbero essere interpretati come di per sé diagnostici.

## **PRESTAZIONI CARATTERISTICHE**

### ■ **SPECIFICITA' CLINICA E SPECIFICITA'**

Malattia	Campione	Percent. di
PBC	111/123	90.2%
AIH I	1/27	3.7%
AIH II	0/4	0.0%
HBV	0/44	0.0%
HCV	2/46	4.3%
Siero Normale	3/168	1.8%

PBC: Cirrosi biliare primaria

AIH: Epatite autoimmune;

HBV: Epatite B

HCV: Epatite C

### ■ **RIPRODUCIBILITA' (INTRA-ASSAY)**

Quando 3 differenti campioni sono stati testati ripetutamente più di 8 volte, CV di ogni campione è risultato inferiore al 15 %.

### ■ **RANGE DEL DOSAGGIO**

Il range del dosaggio di questo kit è compreso tra 5 U/mL e 300 U/mL.

### ■ **SOSTANZE INTERFERENTI**

Emoglobina (sopra 480 mg/dL), Bilirubina (sopra 20.0 mg/dL), chilo (sopra 2,780 unit come Formazine) e/o Fattore Reumatoide (sopra 520 IU/mL) non influiscono sul risultato del dosaggio, ma si eviti di usare campioni altamente emolizzati o altamente lipemici.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Berg,P.A. et al: Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. J.Hepatol, 1986, 2 :123
2. Gershwin,M.E. et al: Identification of the mitochondrial enzymes that react with autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. FASEB J., 1988, 2 :2344
3. Leung PS, et al: Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. Hepatology 1995, 22: 505-513
4. Moteki S et al: Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domains for the detection of antimitochondrial autoantibodies. Hepatology 1996, 24: 97-103

\*\*The following symbols are used on the label.

\*\*Les symboles suivants ont été utilisés sur l'étiquette.

\*\*Die folgenden Symbole finden Sie auf dem Etikett.

\*\*Los siguientes símbolos son utilizados en las etiquetas.

\*\*I seguenti simboli sono usati sulle etichette.

\*\*Os símbolos seguintes são usados no rótulo.



For in vitro diagnostic use  
Dispositif médical de diagnostic in vitro  
Für in-vitro Diagnostik  
Para uso diagnóstico in vitro  
Per uso diagnostico in vitro



Catalogue number  
Référence du catalogue  
Artikelnummer  
Número de catálogo  
Numero di catalogo



Lot  
Code du lot  
Charge  
Lote  
Lotto



See instructions for use  
Consulter les instructions d'utilisation  
Siehe Packungsbeilage  
Ver instrucciones de uso  
Vedi Istruzioni per l'uso



Use by  
Utiliser jusque  
Haltbarkeit  
Temperatura de uso  
Usò da



Store at 2 – 8°C  
Limites de température : 2 à 8°C  
Lagerung bei 2 – 8°C  
Conservar a 2 – 8°C  
Conservare a 2 – 8°C



Manufactured by  
Fabricant  
Hersteller  
Fabricado por  
Prodotto da



Authorized Representative  
Mandataire dans la Communauté européenne  
Bevollmächtigter  
Representane Autorizado  
Rappresentante Autorizzato

**Manufactured for:**

**CORGENIX, INC.**

11575 Main Street, Suite 400  
Broomfield, Colorado 80020 USA  
REAADS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.  
© 2007, Corgenix, Inc.



**MT Promedt Consulting GmbH**

Altenhofstrasse 80  
D-66386 St. Ingbert / Germany

11429 01  
Effective: 2007-01-19

