



Anticorps anti-michondries de type 2 (AMA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38098 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-michondries de type 2 (AMA) dans le sérum humain. La présence des anticorps anti-michondries 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-michondries (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 auto-immune, 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-michondries de type 2 Menarini™ est un immunodosage spécifique et sensible pour la découverte des anticorps anti-michondries 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-michondries 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'A. Menarini Diagnostics S.r.l.. 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 Menarini™ **REF** 38098

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	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.

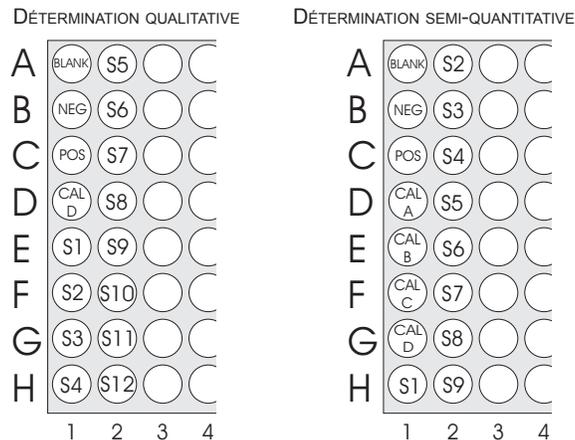
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques 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.



- Étape 13** Incuber les micropuits pendant 30 minutes (\pm 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 calibreurs, 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 calibreur 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 Calibreur 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

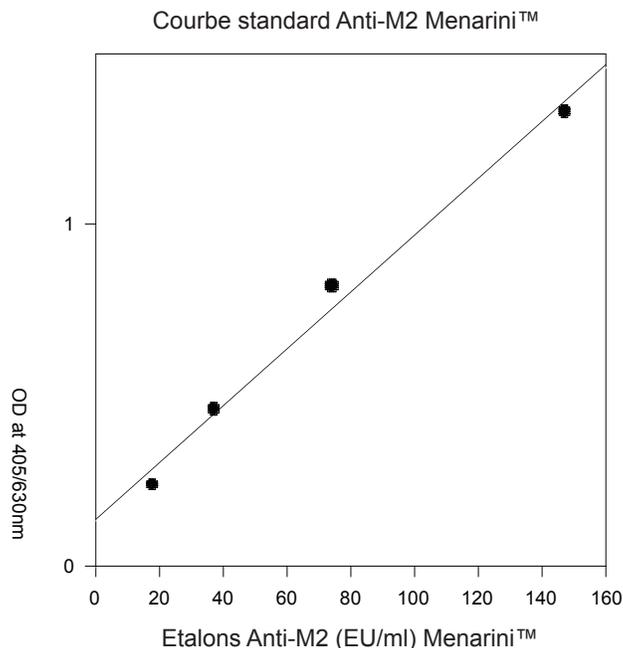
Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

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.





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-michondries 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-michondries 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-michondries Menarini™ a été comparé avec une trousse de test par immunofluorescence pour la détection des anticorps anti-michondries 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-michondries

		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 %


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-michondries 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



REFERENCES • BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • 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.



 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argypopolis
Attiki

AT

ÖSTERREICH
Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

BE

BELGIQUE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

PT

PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND
Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007
Data de publicação: Março de 2007
Ausgabedatum: März 2007
Date d'émission : Mars 2007
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI3163 CE M

