


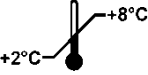




REF 46316 	<b>ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)</b>	Distribué par 
<b>MODE D'EMPLOI</b>	   50	

## DESTINATION D'USAGE

Le test *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2) (AMA-M2)* est un essai immunologique par chimiluminescence (CLIA) pour la détermination quantitative des anticorps spécifiques de classe IgG contre les antigènes mitochondriaux, à l'aide de l'instrumentation dédiée *ZENIT RA Analyser*, dans des échantillons de sérum ou de plasma humaine (EDTA ou citrate de sodium).

Ce dosage est utilisé comme dispositif diagnostique dans l'évaluation de la cirrhose primitive biliaire (PBC).

ATTENTION : Aucune décision médicale ne peut se baser uniquement sur le résultat de ce test. Il s'agit d'évaluer l'ensemble de toutes les données cliniques et de laboratoire disponibles.

## SIGNIFICATION CLINIQUE

La cirrhose primitive biliaire (PBC) est une maladie auto-immune qui provoque une inflammation chronique des voies biliaires intra-hépatiques. La destruction progressive des cellules hépatiques provoque la fibrose et la cirrhose hépatique et peut engendrer, dans le temps, une insuffisance hépatique, jusqu'à provoquer la nécessité de procéder à une greffe du foie<sup>1,2</sup>. La cause précise de la PBC n'est pas connue ; elle implique des facteurs génétiques, liés à une dysfonction du système immunitaire, ainsi que des facteurs environnementaux, comme l'interaction de l'organisme avec certains agents infectieux<sup>3,4,5</sup>.

La PBC touche plus fréquemment les femmes, avec un pic de survenue entre 40 et 60 ans<sup>6</sup>, sans différences de race, mais selon une grande variabilité géographique, qui passe de 40 à 400 sujets par million dans la population générale, car elle est plus commune en Europe du Nord et aux États-Unis<sup>7</sup>.

Dans la moitié des cas, la PBC est diagnostiquée par hasard, lorsque des niveaux anormaux des marqueurs de pathologie hépatique sont relevés au cours d'autres examens ou dépistages : les transaminases (AST et ALT), et surtout les indices de cholestase ( $\gamma$ -GT et de phosphatase alcaline).

Le diagnostic est donné par la présence de deux critères au moins parmi les trois suivants :

- la recherche des anticorps anti-mitochondrie (AMA) à titre adéquat (> 1:40) est positive
- les valeurs de phosphatase alcaline restent élevées pendant plus de 6 mois (plus de 1,5 fois la limite supérieure durant la période de référence)
- biopsie hépatique avec cadre histologique compatible

Le diagnostic emploie le terme PBC définie lorsque les trois critères sont présents, et le terme PBC probable lorsque deux critères uniquement sont positifs<sup>8</sup>.

Les AMA à titre élevé constituent le marqueur immuno-sérologique le plus sensible et le plus spécifique de PBC, car ils apparaissent dans 90-95%<sup>9,10</sup> des patients, avec une spécificité proche de 100%. Il convient toutefois de souligner que la fréquence des anticorps identifiés dépend du groupe étudié, et la sensibilité pourrait être inférieure<sup>11</sup>.

9 sous-types d'antigènes mitochondriaux ont été classés, selon leur structure immunochimique. Ils sont dits de M1 à M9<sup>12</sup>. Seuls les anticorps anti-M2, anti-M4, anti-M8 et anti-M9 sont spécifiques à la PBC et, parmi ceux-ci, seuls les anti-M2 (spécificité pour la pyruvate-déshydrogénase) ont une valeur diagnostique, car ils sont présents à titrage élevé chez presque tous les patients ; les trois autres peuvent être présents à titrage bas et ils ne sont jamais présents seuls, mais toujours associés aux anti-M2<sup>13</sup>. L'antigène M2 comprend en réalité 4 auto-antigènes différents, qui font partie de l'ensemble structural de l'enzyme pyruvate-déshydrogénase<sup>14</sup>, à laquelle correspondent 4 types différents d'anticorps qui ne réagissent pas entre eux. Les anticorps les plus souvent relevés sont ceux qui sont dirigés contre le composant E2 (2-oxo-acide-déshydrogénase)<sup>14</sup> ; les autres apparaissent moins fréquemment et sont généralement associés aux anti-E2<sup>13</sup>. Les antigènes spécifiques ont été identifiés comme des sous-unités du complexe pyruvate-déshydrogénase (PDC-E2), du complexe 2-oxo-acide-déshydrogénase de la chaîne ramifiée (BCOADC-E2) et du complexe 2-oxoglutarate déshydrogénase (OGDC-E2).

Les tests pour la détermination des AMA basés sur l'utilisation de l'association des trois antigènes indiquent des prestations supérieures par rapport au test IFA, ce qui permet de relever des anticorps AMA dans plus de deux tiers des sérums des patients négatifs à la PBC AMA lors du test IFA<sup>15,16</sup>. La présence des anticorps AMA pouvant précéder le développement de la maladie symptomatique, la capacité d'identifier précisément la présence de marqueurs de la PBC peut contribuer à un diagnostic et à un traitement précoce, et peut également ralentir la progression de la maladie<sup>17,18</sup>.

## PRINCIPE DE LA METHODE

---

Le kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* de détermination quantitative des IgG spécifiques aux antigènes mitochondriaux applique une méthode immunologique indirecte en deux phases basée sur le principe de la chimiluminescence.

L'antigène spécifique est utilisé pour recouvrir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps anti-IgG humain est marqué à l'aide d'un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué).

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

Durant la seconde incubation, le conjugué réagit avec les anticorps anti-M2 IgG emprisonnés par la phase solide.

Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est éliminé par aspiration, suivie d'un lavage.

La quantité de conjugué marqué qui est restée liée à la phase solide est évaluée en activant la réaction de chimiluminescence et en mesurant le signal lumineux. Le signal qui est généré, exprimé en unités relatives de lumière (RLU, Relative Light Unit), indique la concentration des anticorps spécifiques présents dans l'échantillon, les étalons et les contrôles.

## AUTOMATISATION

L'instrument *ZENIT RA Analyser* exécute automatiquement toutes les opérations prévues par le protocole de dosage : dans le récipient de réaction, ajout des échantillons, étalons, contrôles, particules magnétiques, conjugué et solutions d'activation de la chimiluminescence ; séparation magnétique et lavage des particules ; mesurage de la lumière émise.

Le système calcule les résultats du dosage pour les échantillons et contrôles à l'aide de la courbe d'étalonnage mémorisée, puis imprime un rapport qui comprend toutes les informations relatives au dosage et au patient.

## MATÉRIEL ET RÉACTIFS

*Matériel et réactifs fournis*

REAG	1	MP	2,5 mL
------	---	----	--------

Particules magnétiques recouvertes d'antigène recombinant contenant des régions immunodominantes de PDC-E2, BCOADC-E2 et OGDC-E2 mitochondriaux (MIT3) dans un tampon phosphate contenant des protéines stabilisatrices, un tensioactif, du Pro-Clin 300 et de l'azoture de sodium (< 0,1 %) comme conservateurs.

REAG	2	CONJ	15 mL
------	---	------	-------

Anticorps monoclonal anti-IgG humain marqué par un dérivé d'ester d'acridinium (conjugué), dans un tampon phosphate contenant des protéines stabilisatrices et de l'azoture de sodium (< 0,1%) comme conservateur.

REAG	3	4	DIL	25 mL x 2 flacons
------	---	---	-----	-------------------

Solution de dilution des échantillons : Tampon phosphate contenant de l'albumine sérique bovine, un tensioactif, un colorant bleu inerte, du Pro-Clin 300 et de la Gentamicine SO<sub>4</sub> comme conservateurs.

REAG	5	CAL A	0,5 mL
------	---	-------	--------

Sérum humain à basse concentration d'anticorps anti-M2 IgG contenant de l'azoture de sodium (< 0,1%) comme conservateur.

REAG	6	CAL B	0,5 mL
------	---	-------	--------

Sérum humain à haute concentration d'anticorps anti-M2 IgG contenant de l'azoture de sodium (< 0,1%) comme conservateur.

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

Les réactifs 1, 2, 3 et 4 sont assemblés dans un seul ensemble qui constitue la cartouche des réactifs.

Les concentrations des étalons sont exprimées en AU/mL (Unités Arbitraires) et étalonnées selon un standard de référence interne. Les valeurs des concentrations, spécifiques par lot de produit, sont enregistrées dans le DATA DISK inclus dans le kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenant les informations traitant de tous les produits de la gamme ZENIT RA (réactifs, étalons, sérums de contrôle) actualisées au dernier lot de production, à l'exclusion des produits périmés à la date à laquelle le nouveau DATA DISK a été compilé.

Il suffit de conserver le DATA DISK et le numéro de lot le plus élevé pour toujours disposer des dernières informations nécessaires au bon fonctionnement du système.

Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis dans le kit

- |  |               |
|--|---------------|
| - ZENIT RA Analyser <sup>(1)</sup>   | Code N° 41400 |
| - ZENIT RA Cuvette Cube <sup>(1)</sup><br>Boîte de 960 cuvettes  | Code N° 41402 |
| - ZENIT RA System Liquid <sup>(2)</sup><br>1 bouteille de 5 litres de solution prête à l'emploi  | Code N° 41409 |
| - ZENIT RA Wash Solution <sup>(2)</sup><br>1 bouteille de 10 litres de solution prête à l'emploi   | Code N° 41407 |
| - ZENIT RA Trigger Set <sup>(2)</sup><br>1 flacon de 250 mL de Trigger A (solution de pré-activation)<br>1 flacon de 250 mL de Trigger B (solution d'activation) | Code N° 41403 |
| - ZENIT RA D-SORB Solution<br>Boîte de 2 bouteilles de 1 litre de solution prête à l'emploi  | Code N° 41436 |
| - ZENIT RA Cartridge Checking System <sup>(2)</sup>  | Code N° 41401 |
| - ZENIT RA Top Cap Set<br>300 bouchons supérieurs rouges pour la fermeture des récipients des étalons après la première utilisation.                             | Code N° 41566 |

<sup>1)</sup> Fabriqués par IDS France SAS, 42 rue Stéphane Mazeau, 21320 Pouilly en Auxois, France et distribués par A. Menarini Diagnostics Srl.

<sup>(2)</sup> Fabriqués par IDS SA, 101-103 rue Ernest Solvay, 4000 Liège, BELGIQUE et distribués par A. Menarini Diagnostics Srl.

#### Autres réactifs recommandés

ZENIT RA LIVER CONTROL SET

Code N° 46317

3 ampoules de 1 mL de sérum humain négatif et 3 ampoules de 1 mL de sérum humain positif aux anticorps anti-AMA-M2.

#### AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

---

Les réactifs fournis dans le kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* sont uniquement pour usage diagnostique in vitro pour les hommes ou les animaux.

Ce produit doit être utilisé dans le respect scrupuleux des indications fournies dans le présent document et par du personnel professionnel.

Menarini ne peut être tenue pour responsable en cas de pertes ou de dommages dus à un usage non conforme aux indications fournies.

#### Mesures de sécurité

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

Ce produit contient des composants d'origine humaine. Toutes les unités de sérum ou de plasma utilisées pour la fabrication des réactifs de ce kit ont été analysées à l'aide de méthodes approuvées par la FDA. Elles ne réagissent pas à la présence de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 et anti-HIV2.

Toutefois, aucune méthode d'analyse n'étant en mesure de garantir l'absence d'agents pathogènes, tout le matériel d'origine humaine doit être considéré comme potentiellement infecté et manipulé comme tel.

Si l'emballage est endommagé ou que des réactifs se déversent, veiller à décontaminer la zone affectée avec une solution diluée d'hypochlorite de sodium en portant des équipements de protection individuelle (blouse, gants, lunettes).

Éliminer les produits utilisés pour le nettoyage et les déchets issus du déversement, selon les normes nationales d'élimination des déchets potentiellement infectieux.

Certains réactifs comprennent de l'azoture de sodium comme conservateur. L'azoture de sodium pouvant réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton plombé en formant des azotures explosifs dans les conduits, il est recommandé de ne pas éliminer les réactifs ou les déchets dans les égouts, mais d'appliquer les normes nationales en matière de mise au rebut des déchets potentiellement dangereux.

#### Précautions d'usage

Pour obtenir des résultats fiables, se tenir strictement aux instructions présentes et suivre scrupuleusement les indications reportées dans le manuel opératoire de l'instrument.

Les réactifs fournis dans le kit doivent être utilisés exclusivement à l'aide du système *ZENIT RA Analyser*.  
Les composants de la cartouche de réactifs ne peuvent pas être séparés de celle-ci puis réassemblés.  
Ne pas utiliser le kit au-delà de la date de péremption.

## PREPARATION DES REACTIFS

---

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

## CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

---

Conserver les réactifs fournis dans le kit à 2-8°C, à la verticale et dans l'obscurité.

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

Après l'ouverture, la cartouche de réactifs peut être utilisée pendant 60 jours si elle est conservée au réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8°C ou dans la machine.

Après l'ouverture, les étalons peuvent être utilisés pendant 60 jours s'ils sont conservés au réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8°C et s'ils ne restent pas plus de 6 heures dans la machine pour chaque séance.

Ne pas congeler les réactifs et les étalons.

## PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

---

Le dosage doit être effectué sur des échantillons humains de sérum et de plasma (EDTA ou citrate de sodium).

Il est déconseillé d'utiliser des échantillons lipémiques, hémolysés et troubles.

Si le dosage est effectué après plus de 8 heures, séparer le sérum ou le plasma du noyau, des globules rouges et des éprouvettes de séparation avec un gel.

Avant d'être analysés, les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur, à une température comprise entre 2 et 8°C, pendant 7 jours maximum.

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

Éviter de décongeler et recongeler de manière répétée.

## PROCEDURE OPERATOIRE

---

Pour obtenir des prestations analytiques fiables, se tenir scrupuleusement aux instructions reportées dans le manuel opératoire de l'instrument.

### Chargement des réactifs

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

Avant d'introduire la cartouche de réactifs dans le système, agiter le récipient des particules magnétiques par rotation horizontale, de façon à favoriser la remise en suspension des particules. Durant cette opération, veiller à éviter la formation de mousse.

Placer la cartouche de réactifs dans la zone de l'instrument prévue à cet effet. Pour ce faire, utiliser le guide et agiter pendant 40 minutes au moins avant l'utilisation.

La mise en place de la cartouche de réactifs provoque également la lecture du code-barres d'identification. Si l'étiquette de la cartouche est endommagée ou si la lecture n'est pas effectuée, les données d'identification de la cartouche de réactifs peuvent être saisies manuellement.

L'instrument assure automatiquement l'agitation continue des particules magnétiques.

Si la cartouche de réactifs est retirée de l'instrument, la conserver à la verticale et dans l'obscurité à une température comprise entre 2 et 8°C.

### Chargement des étalons

Les étalons ZENIT RA sont prêts à l'emploi. Laisser les étalons à température ambiante pendant 10 minutes et agiter délicatement le contenu, manuellement ou à l'aide d'un vortex, en évitant la formation de mousse.

Si les étalons sont utilisés pour la première fois, retirer le sceau de garantie et le bouchon blanc avant de les introduire dans l'instrument.

Si les étalons ont déjà été utilisés, le bouchon supérieur du récipient (bouchon rouge) ne portera plus le sceau de garantie. Retirer le bouchon de fermeture rouge avant de les introduire dans l'instrument.

Introduire les étalons dans la zone de l'instrument prévue pour les échantillons ; pour les identifier sur l'instrument, consulter le mode d'emploi de l'instrument. Si l'étiquette est endommagée ou si la lecture n'est pas effectuée, saisir manuellement les données des code-barres.

Les valeurs de la concentration d'anticorps AMA-M2 classe IgG dans les étalons sont enregistrées dans le DATA DISK et transférées automatiquement dans l'analyseur.

Au terme de la séance, les récipients contenant les étalons doivent être fermés à l'aide des bouchons prévus (bouchons rouges) et conservés à une température comprise entre 2 et 8°C jusqu'à leur prochaine utilisation.

Les étalons peuvent être utilisés quatre fois au maximum.

### Chargement des contrôles

Introduire les contrôles dans la zone de l'instrument prévue à cet effet. Pour leur identification sur l'instrument, consulter le mode d'emploi de l'instrument. Si aucun code-barres n'est présent sur le contrôle ou si la lecture n'est pas effectuée, les données d'identification du contrôle peuvent être saisies manuellement. Si les contrôles Zenit RA sont utilisés, consulter les instructions pertinentes. Les valeurs de la concentration d'anticorps IgG AMA-M2 dans les contrôles Zenit RA sont enregistrées dans le DATA DISK et transférées automatiquement dans l'analyseur.

Pour chaque contrôle, sélectionner les paramètres requis.

### Chargement des échantillons

Introduire les échantillons dans la zone de l'instrument prévue pour les échantillons ; pour les identifier sur l'instrument, consulter le mode d'emploi de l'instrument. Si aucun code-barres n'est présent sur l'échantillon ou si la lecture n'est pas effectuée, les données d'identification de l'échantillon peuvent être saisies manuellement.

Pour chaque échantillon, sélectionner les paramètres requis.

### Étalonnage

L'instrument *ZENIT RA Analyser* utilise une courbe d'étalonnage mémorisée (master curve), générée par le producteur pour chaque lot de cartouches de réactifs.

Les paramètres des « master curve » et les valeurs des concentrations des étalons sont mémorisés dans le DATA DISK et transférés dans la base de données de l'instrument.

Les étalons A et B sont utilisés pour ré-étalonner les « master curve » en fonction de l'instrument utilisé et des réactifs placés dans la machine.

Pour effectuer le ré-étalonnage, analyser en triple les deux étalons, A et B, et les contrôler en simple. Les valeurs de concentration obtenues avec les contrôles permettent de valider le nouvel étalonnage.

Lorsque le ré-étalonnage de la « master curve » a été accepté et mémorisé, tous les échantillons suivants peuvent être analysés sans autre étalonnage, sauf dans les cas suivants :

- lorsqu'une cartouche de réactifs avec un nouveau lot est chargée sur l'instrument ;
- lorsque les valeurs des contrôles ne sont pas comprises dans la gamme d'acceptabilité ;
- lorsque la procédure de maintenance de l'instrument est effectuée ;
- lorsque la validité de la « master curve » ré-étalonnée est arrivée à échéance.

La validité de la « master curve » ré-étalonnée pour le kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* est de 21 jours.

La gestion du ré-étalonnage est exécutée automatiquement par l'instrument.

### Dosage

Appuyer sur le bouton de démarrage.

1. Le système aspire 100µL de solution de dilution pour échantillons, 40µL de particules magnétiques, 80µL de solution de dilution pour échantillons et 10µL d'échantillon, d'étalons ou de contrôles pré-dilués à 1:10 automatiquement par l'instrument. Les solutions et la suspension aspirées sont dispensées dans la cuvette de réaction.
2. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37°C pendant 10 minutes.
3. Après cette phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées.
4. 200µL de conjugué sont dispensés dans la cuvette.
5. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37°C pendant 10 minutes.
6. Après cette dernière phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées, et la cuvette est transférée dans la chambre de lecture.
7. La quantité de conjugué lié à la phase solide, exprimée en RLU, est directement proportionnelle à la concentration d'IgG AMA-M2 présente dans l'échantillon.
8. Les réponses obtenues sont comparées à la courbe d'étalonnage et transformées en concentrations.



---

## CONTROLE DE LA QUALITE

---

Pour assurer la validité du dosage, des sérums de contrôle à différentes concentrations (au moins un sérum négatif et un sérum positif) doivent être mesurés chaque jour si le dosage est effectué.

Si le laboratoire le demande, un usage plus fréquent ou un plus grand nombre de contrôles doivent être appliqués afin de vérifier les résultats du dosage. Suivre les procédures du contrôle de qualité établies.

Si les sérums de contrôle ZENIT RA sont utilisés, les valeurs moyennes attendues et les limites d'acceptabilité sont celles qui sont reportées dans le DATA DISK fourni dans l'emballage des contrôles.

Si d'autres sérums de contrôle sont utilisés, définir avant de les utiliser les valeurs attendues avec les réactifs et le système ZENIT RA.

Si la valeur des contrôles n'est pas comprise dans la gamme d'acceptabilité spécifiée, les résultats du dosage ne sont pas valables et les échantillons respectifs doivent être soumis à une nouvelle analyse.

Dans ce cas, appliquer une procédure de ré-étalonnage avant d'effectuer le nouveau dosage.

---

## CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

---

### Calcul des résultats

La concentration d'anticorps IgG anti AMA-M2 présents dans les échantillons examinés est calculée automatiquement par le système. Les valeurs peuvent être affichées à l'écran ou imprimées.

Les concentrations sont exprimées en AU/mL.

Le calcul de la concentration d'analyte dans l'échantillon est effectué à travers la lecture de la réponse obtenue pour chaque échantillon sur une courbe d'étalonnage élaborée par un système de « fitting » logistique à quatre paramètres (4PL, Y pondéré), corrigée périodiquement en fonction des réponses obtenues dans le dosage des étalons.

Pour obtenir de plus amples informations sur la manière dont le système calcule les résultats, consulter le manuel opératoire du système.

### Interprétation des résultats

La gamme de mesurabilité du dosage *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* est la suivante : 0,0 – 1000 AU/mL.

Les valeurs inférieures à 0,0 AU/mL sont les valeurs extrapolées ; le message « OMR- » et/ou ORA s'affiche et elles sont reportées avec une valeur « égale à 0,0 AU/mL ».

Les valeurs supérieures à 1000 AU/mL affichent le message « OMR+ » et/ou ORA et peuvent être soumises à un nouvel essai après dilution.

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

---

(AU/mL)	Interprétation
< 10	L'échantillon doit être considéré négatif à la présence d'IgG anti-AMA-M2
≥ 10	L'échantillon doit être considéré positif à la présence d'IgG anti-AMA-M2

---

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

#### LIMITES DU DOSAGE

---

Aux fins du diagnostic, les résultats obtenus à l'aide du kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* et du système *ZENIT RA Analyser* doivent être utilisés en association avec les autres données cliniques et de laboratoire dont le médecin dispose.

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

Les anticorps hétérophiles présents dans les échantillons de sérum humain peuvent réagir avec les réactifs à base d'immunoglobuline, provoquant des interférences dans les dosages immunologiques in vitro. Ces échantillons peuvent provoquer des valeurs anormales s'ils sont analysés à l'aide du kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)*.

#### VALEURS ATTENDUES

---

Les échantillons de 100 sujets de la routine normale de laboratoire ont été analysés, après avoir été sélectionnés de manière aléatoire afin de vérifier la présence d'anticorps IgG AMA-M2.

Tous les échantillons analysés ont affiché des résultats négatifs, avec une valeur moyenne de 0,7 AU/mL et une déviation standard de 1,5 AU/mL.

La « Limit of Blank » (LoB = valeur la plus haute que l'on peut attendre dans une série d'échantillons ne contenant pas l'analyte) a été calculée à l'aide des résultats. La « Limit of Blank », définie comme 95° pour cent de la population négative, est apparu comme égale à 3,8 AU/mL avec le lot de réactifs n° 2.

#### SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE (CLINIQUE)

---

Un total de 664 échantillons ont été analysés à l'aide du kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)*, dont 119 provenaient de patients atteints de cirrhose primitive biliaire (PBC), 66 de patients atteints d'hépatite auto-immune de type 1 (EAI-1) ou de type 2 (EAI-2), 41 de patients atteints d'hépatite C (HCV), 20 de patients atteints d'hépatite B (HBV), 18 de patients atteints de colangite sclérosante primitive (PS) et 400 étaient des échantillons théoriquement normaux, provenant de la routine du laboratoire.

Dans la population théoriquement négative étudiée, qui comprenait 66 échantillons de patients atteints d'hépatite auto-immune de type 1 (EAI-1) ou de type 2 (EAI-2), 41 atteints d'hépatite C (HCV), 20 d'hépatite B (HB), 18 de colangite sclérosante primitive (PSC) et 400 échantillons normaux, il est apparu que 15 échantillons étaient positifs et 504 négatifs.

- **Spécificité diagnostique : 97,2 % (530/545)**

Parmi les 15 échantillons « non négatifs », 8 appartenaient au groupe de patients présentant une EAI-1 ou EAI-2, 2 appartenaient au groupe de patients atteints de HCV et 5 au groupe d'échantillons normaux.

Parmi les 5 échantillons normaux ayant fourni un résultat positif, 4 ont confirmé qu'ils étaient positifs à l'aide d'une méthode ELISA commerciale.

Dans la population estimée positive étudiée, qui comprenait 119 échantillons de patients atteints de PBC, 87 sont apparus positifs et 32 négatifs.

- **Sensibilité diagnostique : 73,1 % (87/119)**

Parmi les 32 échantillons dont les résultats étaient négatifs, 27 ont confirmé qu'ils étaient négatifs à l'aide d'une méthode ELISA commerciale.

Sur la base des résultats de la spécificité et de la sensibilité diagnostique, **l'accord diagnostique est de 93,0 % (617/664).**

## PRESTATIONS

Avertissement : les données présentées ne représentent pas les spécifications de fonctionnement du kit, mais elles constituent une preuve expérimentale du fonctionnement du kit dans ces spécifications, selon la manière prévue par le producteur.

### Précision et reproductibilité

La précision et la reproductibilité du kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* ont été évaluées à l'aide d'un protocole basé sur les directives du document EP5-A2 du Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

La **précision** a été calculée en analysant les résultats de 20 réplicats de quatre sérums (un négatif et trois positifs à des concentrations différentes d'IgG anti-AMA-M2) effectués sur deux lots différents durant la même séance expérimentale.

La concentration du sérum anti-AMA-M2 IgG négatif (N2) a toujours été de 0,0 AU/mL avec le lot de réactifs n° 1 et n° 2.

Le tableau indique les résultats obtenus à partir des 3 sérums positifs.

Échantillon	Réactifs Lot n°	Concentration moyenne (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	51,7	1,86	3,6
	2	35,5	1,89	5,3
P2	1	100,0	2,96	3,0
	2	92,6	1,50	1,6
P3	1	728,3	30,11	4,1
	2	649,6	24,72	3,8

La **reproductibilité** a été calculée en analysant les résultats de la détermination de quatre sérums (un négatif et trois positifs, avec différentes concentrations d'IgG anti-AMA-M2) effectuée en simple, en 30 séances, avec deux lots de réactifs différents.

La concentration de sérum anti-AMA-M2 IgG négatif (N2) a toujours été de 0,0 AU/mL.

Le tableau indique les résultats obtenus à partir des 3 sérums positifs.

Échantillon	Concentration moyenne (AU/mL)	SD	CV %
P1	89,5	4,00	4,5%
P2	97,2	4,27	4,4%
P3	658,2	33,41	5,1%

#### Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* a été évaluée à l'aide de deux protocoles basés sur les directives du document EP17-A du Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

Dans un cas exprimé comme la **limite de détection** (*Limit of Detection – LoD* : c'est-à-dire la plus petite quantité d'analyte que la méthode peut mesurer) la formule de calcul  $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$  (où LoB est la valeur de la « Limit of Blank »,  $SD_s$  la déviation standard estimée de la répartition de l'échantillon à basse concentration et  $C_{\beta}$  est dérivé de 95° pour cent de la distribution standard gaussienne) a été appliquée.

3 échantillons à basse concentration d'analyte ont été utilisés, déterminés en simple à partir d'un lot de réactifs lors de 15 expériences différentes.

La Limite de détection du kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* a été établie à 5,7 AU/mL.

L'autre protocole prévoit le calcul de la **Concentration minimum mesurable** ou MDC (*Minimum Detectable Concentration*) : 20 réplicats de la solution du Standard 0 AU/mL de la courbe Master ont été utilisés. La moyenne et la déviation standard (DS) sur un lot du kit ont ainsi été élaborées. La valeur de RLU relative à la moyenne + 2,6 DS a été appliquée sur la courbe afin d'obtenir la concentration relative.

La sensibilité analytique exprimée comme la Concentration minimum mesurable est de 0,3 AU/mL.

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

#### Spécificité analytique : Interférences

Une étude basée sur les directives du document EP7-A2 du CLSI a montré que les prestations du dosage ne sont pas influencées par la présence dans l'échantillon de produits potentiellement interférents énoncés dans le tableau suivant, jusqu'à la concentration expérimentée.

Produits potentiellement interférents	Concentration maximum expérimentée
Bilirubine libre	20 mg/dL
Bilirubine conjuguée	20 mg/dL
Hémoglobine	1000 mg/dL
Acides gras	3000 mg/dL

Il est en tout cas déconseillé d'utiliser des échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles.

### Spécificité analytique : Réactions croisées

Pour évaluer les réactions croisées potentielles de l'antigène utilisé aux fins de la sensibilisation des microparticules, une étude a été conduite sur 40 échantillons, dont tous présentaient des niveaux élevés d'autres auto-anticorps et tous étaient négatifs à l'IgG anti-AMA-M2.

Les échantillons utilisés étaient répartis comme suit : SS-A (2), SS-B (2), U1-snRNP (2), Jo-1 (2), Scl-70 (2), Cenp B (2), Sm (2), PR3 (2), MPO (2),  $\beta_2$ -GLI/CL (2), Gliadine (2), t-TG (2), CCP (2), GBM (2), dsDNA (2), TG (3), TPO (3) et facteur rhumatoïde (RF) (4).

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

### Effet de saturation et doses élevées

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

La méthode employée dans le kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* étant une méthode à deux incubations, elle ne subit pas cet effet.

Un échantillon d'une concentration extrêmement élevée (supérieure à la gamme de mesure) de l'IgG anti-AMA-M2 a confirmé l'absence d'effet « hook » jusqu'à une concentration de 22000 AU/mL.

### Sensibilité et spécificités relatives

La présence d'anticorps AMA-M2 IgG a été déterminée en utilisant le kit *ZENIT RA Anti-Mitochondrial Antibodies (M2)* et une méthode de dosage ELISA disponible dans le commerce sur 341 échantillons : 119 échantillons provenaient de patients atteints de cirrhose primitive biliaire (PBC), 75 de patients atteints d'hépatite auto-immune de type 1 (EAI-1) ou de type 2 (EAI-2), 41 de patients atteints d'hépatite C (HCV), 20 de patients atteints d'hépatite B (HBV), 18 de patients atteints de colangite sclérosante primitive (PSC) et 68 étaient des échantillons théoriquement normaux, provenant de la routine du laboratoire.

18 échantillons ont fourni des résultats incohérents entre le dosage ZENIT RA et le dosage ELISA disponible dans le commerce.

La **correspondance relative** a donc atteint un niveau de 94,7 % (Intervalle de confiance de 95% : 91,6–96,8 %) (323/341).

La **sensibilité relative** a atteint un niveau de 88,9 % (Intervalle de confiance de 95% : 81,0–93,9 %) (96/108).

La **spécificité relative** a atteint un niveau de 97,4 % (Intervalle de confiance de 95% 94,2 : – 98,9%) (227/233).

### Sérum de référence

La quantité d'anticorps AMA-M2 IgG présents dans l'échantillon « cirrhose primitive biliaire », HUMAN NIBSC code 67/183 mesurée à l'aide du kit *ZENIT RA*, s'élevait à 420 AU/mL.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan K, Bergasa NV, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009 ; 50 : 291-308.
2. Crosignani A, Battezzati PM, Invernizzi P, Selmi C, Prina E, Podda M. Clinical features and management of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008 Jun 7 ; 14(21) : 3313-27.
3. Giorgini A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Zuin M, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis : solving the enigma. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051 : 185-93.
4. Long SA, Quan C, van de Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Barsky D, et al. Immunoreactivity of organic mimeotopes of E2 components of pyruvate dehydrogenase : connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J. Immunol* 2001; 167: 2956-63.
5. Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis : convenient and inconvenient truths. *Hepatology* 2008; 47: 737-45.
6. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353 : 1261-73.
7. Selmi C, Invernizzi P, Zuin M, Podda M, Gershwin ME. Genetics and geoeidemiology of primary biliary cirrhosis : following the footprints to disease etiology. *Semin Liver Dis* 2005; 25 : 265-80.
8. James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom. *Hepatology* 1999; 30: 390-4.
9. Hirschfield GM, Heathcote EJ. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Clin Liv Dis* 2008; 12:323-31.
10. Liu B, Shi XH, Zhang FC, Zhang W, Gao LX. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis : a subset of primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2008; 28:233-9.
11. Muratori P. et al. " True " antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis, low sensitivity of the routine assays or both ? *Clin EXP Immunol* 135, 154-158 ( 2004 ).
12. Berg PA, Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies : from anti M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* 64, 897-909 ( 1986 ).
13. Mackay IR, Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis : clinico pathological correlations. In : van Venrooij WJ and Maini RN, eds. *Manual of biological markers of disease.* Dordrecht : Kluwer Academic Publishers,1996; C8.1:1-18
14. Bassendine MF, Fussey SPM, Mutimer DJ, James PFW, Yeaman SJ. Identification and characterization of four M2 mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Sem Liver Dis* 1989 , 9: 124-31.
15. Miyakawa H et al. Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescence AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology* 34,243-248 (2001 ).
16. Moteki S et al. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology* 24,97-103(1996 ).
17. Mitchison HC, Bassendine MF, Hendrick A, Bennett MK, Bird G, Watson AJ, James OF. Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase : is this primary biliary cirrhosis ? *Hepatology* 1986; 6 : 1279-84.

18. Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, Jones DE, Bassendine MF, James OF. Natural history of early primary biliary cirrhosis. Lancet 1996; 348: 1399-402

**TECHNOGENETICS S.r.l.**

Via Vanvitelli, 4  
20129 – Milan – Italie

Site opérationnel : Via della Filanda, 26  
26900 – Lodi – Italie

**FRANCE****Distribué par**

A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L.  
3-5, Rue du Jura - BP 70511- 94633 Rungis Cedex  
Tel. +33 1 56 34 69 10 - Fax +33 1 56 34 69 11  
[www.menarindiagnosics.fr](http://www.menarindiagnosics.fr)

**BELGIQUE et LUXEMBOURG****Distribué par**

Menarini Diagnostics Benelux S.A./N.V.  
Belgicastraat, 4 - 1930 Zaventem  
Tel. +32 2 72 14 545 - Fax +32 2 72 09 292  
[www.menarindiagnosics.be](http://www.menarindiagnosics.be)