

# MASTAZYME™ AMA-M2

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von humanen Antikörpern gegen mitochondriales Antigen (AMA-M2) in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification of human antibodies to mitochondrial antigen (AMA-M2) in serum and plasma

Détection qualitative ou quantitative des anticorps anti-mitochondries M2 dans le sérum ou le plasma humain par la technique ELISA

## Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /  
Usage *in vitro* uniquement



Deutsch:            Seiten 03–09



English:            Pages 10–16



Français:           Pages 17–24

MASTAZYME™ AMA-M2

REF 733017

12 x 8 Tests

**Lagerung / Storage/ Stocker à: 2–8 °C**






MASTAZYME™ AMA-M2 – 2008-01-07

MAST

**Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:**

**Explanations of abbreviations and icons used on labels:**

**Explications des abréviations et icônes sur les étiquettes:**

<b>STRIPS</b>		Mikrotiterstreifen	Microtiter strips	Films pour microplaque
<b>CONTR</b>	<b>+</b>	Positive Kontrolle	Positive control	Contrôle positif
<b>CONTR</b>	<b>-</b>	Negative Kontrolle	Negative control	Contrôle négatif
<b>CAL</b>	<b>1–6</b>	Kalibratoren	Calibrators	Calibrateur
<b>CONJ</b>		HRP-Konjugat	HRP conjugate	Conjugué
<b>DIL</b>		Probenverdünnungspuffer	Sample diluent	Diluant d'échantillon
<b>SUBS</b>		TMB-Substrat	TMB substrate	TMB substrat
<b>STOP</b>		Stopplösung	Stopping solution	Solution d'arrêt
<b>WASH</b>	<b>CONC</b>	Waschpuffer	Washing buffer	Solution de lavage
<b>LOT</b>		Charge	Batch	Lot
<b>REF</b>		Bestellnummer	Order code	Référence
<b>RTU</b>		Gebrauchsfertig	Ready to use	Prêt à l'emploi
		Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
		Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarques importantes
		Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption
		Lagerung bei	Storage	Conservation
		Reagenzien nicht zur Wiederbenutzung geeignet	Reagents not reusable	Ne pas réutiliser les réactifs

	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1.	Einleitung	4
2.	Testprinzip und Verwendungszweck	5
3.	Packungsinhalt	5
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	6
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6
6.	Lagerung und Stabilität	7
7.	Probengewinnung und -handhabung	7
8.	Testdurchführung	7
9.	Auswertung und Interpretation	8
10.	Testcharakteristika	9
11.	Literatur	9

## 1. Einleitung

### Mitochondriale Proteine

#### Antigen

Anti-mitochondriale Antikörper (AMA) sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern, die gegen unterschiedliche Proteine der äußeren und inneren Mitochondrienmembran gerichtet sind. Ihre Zielantigene sind in den Geweben unterschiedlich exprimiert, sodass neben den nicht organspezifischen Subtypen auch Antikörper mit relativ hoher Organspezifität beschrieben werden konnten.

Mittels der Fluoreszenz-Technik an verschiedenen Organschnitten von Leber, Magen, Niere, Herz oder Pankreas lassen sich anti-mitochondriale Autoantikörper unterscheiden. Die genaue Spezifität dieser Antikörper-Subtypen ist jedoch erst teilweise geklärt.

Subtypen	Autoantigen	Mitochondrien Lokalisation	Klinische Relevanz
M1	Cardiolipin	innere Membran	Lues II
M2	Proteine des $\alpha$ -Ketosaure Dehydrogenase-Komplexes	innere Membran	Primäre biliäre Zirrhose (PBC)
M3		äußere Membran	Medikamenten-induzierter LE
M4	Assoziiert mit Sulfitoxidase	äußere Membran	PBC
M5		äußere Membran	SLE und undifferenzierte Kollagenosen, autoimmunhämolytische Anämie
M6		äußere Membran	Medikamenten-induzierte Hepatitis
M7	Sarcosin Dehydrogenase	innere Membran	Kardiomyopathien, Myocarditis
M8		äußere Membran	PBC
M9	Assoziiert mit Glycogen-Phosphorylase	äußere Membran z. T. zytoplasmatisch	PBC

#### Klinische Relevanz

Spezifische anti-mitochondriale Antikörper wurden für die primäre biliäre Zirrhose (PBC) mit den Subtypen M2, M4, M8 und M9 beschrieben. Daneben treten AMA jedoch auch bei anderen Erkrankungen, wie z. B. Kollagenosen (AMA-M5) und bei medikamenten-induzierten Erkrankungen, auf (AMA-M3 und AMA-M6). In der indirekten Immunfluoreszenz auf HEp 2-Zellen findet man beim Vorliegen von

AMA-M2 ein feingestricheltes, zytoplasmatisches, perinukleär verdichtetes Immunfluoreszenzmuster.

Die äußerst heterogen reagierenden anti-mitochondrialen Antikörper des M2-Subtypes richten sich gegen die Proteine von drei verwandten  $\alpha$ -Ketosaure-Dehydrogenase-Komplexen der inneren Mitochondrienmembran. Das wesentliche Epitop ist auf der E2-Untereinheit und dem Protein X des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC) lokalisiert. Daneben richten sich anti-M2 Autoantikörper auch gegen Epitope zweier anderer Untereinheiten (E1 und E3) des o. g. Komplexes und auch gegen die E2-Subunits anderer Multienzymkomplexe wie 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (OGDC) und „branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex“ (BCOADC).

Die Bestimmung von AMA-M2 hat für die Differentialdiagnostik der primären biliären Zirrhose (PBC) eine hohe Bedeutung. Bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, besonders Kollagenosen, ermöglicht der Nachweis auftretender AMA der Subtypen M2 und M9 die rechtzeitige und frühe Erkennung einer sich entwickelnden oder assoziierten PBC.

Neben der Früherkennung und Differentialdiagnostik erlaubt die Bestimmung von AMA-Profilen eine immunologische und prognostische Klassifizierung der primären biliären Zirrhose. So finden sich bei benignen Verlaufsformen der symptomatischen PBC meist ausschließlich AMA-M2 (eventuell in Kombination mit AMA-M9), während progrediente Verlaufsformen und Mischformen mit chronisch akuter Hepatitis (CAH) durch die Assoziation der mitochondrialen Antikörper M2 mit M4 und M8 gekennzeichnet sind.

## 2. Testprinzip und Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ AMA-M2 dient dem Nachweis von Autoantikörpern gegen mitochondriale Proteine in Serum oder Plasma. MASTAZYME™ AMA-M2 ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

Das Testprinzip des ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

### 2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

### 2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-human-IgG bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

### 2.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

### 2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete elektronische Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o. ä.) ermittelt werden.

## 3. Packungsinhalt

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet mit Pyruvatdehydrogenase
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
6 x 1,5 mL	Kalibratoren 1–6	humanes Plasma, enthält spezifische Antikörper, gebrauchsfertig

	AMA-M2 Konzentration [U/mL]
Kalibrator 1	1
Kalibrator 2 (Cut-off)	15
Kalibrator 3	25
Kalibrator 4	50
Kalibrator 5	100
Kalibrator 6	200

1 x 150 µL	Positive Kontrolle	humanes Plasma enthält AMA-M2, nativ, 1:101 verdünnen
1 x 150 µL	Negative Kontrolle	humanes Plasma frei von AMA-M2, nativ, 1:101 verdünnen
2 x 60 mL	Probenverdünnpuffer	PBS Puffer mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-human-IgG (Ziege), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
2 x 50 mL	Waschpuffer 10 x Konz.	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, vor Gebrauch kurz auf 37 °C erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen

#### 4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

#### 5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.

- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.
- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Laborgeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

## 6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfallsdatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden.

Nach dem Öffnen ist das angebochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

## 7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Probenverdünnungspuffer 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden.

## 8. Testdurchführung

### 8.1. Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.

**Waschpuffer:** Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 50 mL Konzentrat + 450 mL dest. Wasser), mischen.

**Kontrollen:** Die Kontrollen sind nicht gebrauchsfertig und sind daher vor dem Ansatz analog den Patientenproben zu verdünnen!

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Nicht benötigte MTP-Streifen sollten in der Hülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

## 8.2. Testablauf

**Hinweis:** Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben, der gebrauchsfertigen Kalibratoren und der vorverdünnten (1:101) Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen bei RT für 15 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden, ca. 5 Minuten stehen lassen.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch anhand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

**Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.**

## 9. Auswertung und Interpretation

### Qualitativ

Zur qualitativen Testauswertung kann entweder der Kalibrator 2 oder 3 verwendet werden, je nachdem, ob grenzwertige Ergebnisse erfasst werden sollen oder nicht. Eine Quantifizierung nur unter Verwendung der Cut-off-definierenden Kalibratoren ist nicht möglich.

### Quantitativ

Die Extinktionswerte der 6 Kalibratoren und die entsprechenden Konzentrationen definieren die Punkte der Eichkurve. Für das Zeichnen der Eichkurve eignet sich besonders halblogarithmisches Millimeterpapier. Die Konzentration der Kalibratoren (s. Etikett bzw. QC-Zertifikat) wird auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen, die entsprechenden Extinktionswerte auf der Ordinate (y-Achse). Die Kalibrationskurve verläuft in der log-lin Auftragung sigmoid. Anhand dieser Kurve kann die Konzentration der Proben dann auf der Abszisse abgelesen werden.

Optional kann die Konzentration der Patientenproben auch mit gängigen Computerprogrammen berechnet werden. Für die Berechnung der Kalibrationskurve ist z. B. die 4-Parameter-Anpassung geeignet.



### **Grenzwerte**

Anhand klinisch definierter Proben sowie gesunder Blutspender wurden nachstehende Normal- und Grenzwerte festgelegt:

negativ:	< 15 U/mL
grenzwertig:	15–25 U/mL
positiv:	> 25 U/mL

### **Empfehlung**

Im Einzelfall sollten die Grenzwertbereiche an das jeweilige Patientenkollektiv angepasst werden.

### **Interpretation der Ergebnisse**

Mit dem Test werden Antikörper gegen den mitochondrialen Dehydrogenase-Komplex nachgewiesen. Dabei werden solche Autoantikörper erfasst, die gegen die 70 kDa-, 50 kDa- und/oder 42kDa-Untereinheiten der Pyruvatdehydrogenase in der inneren Mitochondrienmembran gerichtet sind. Diese Autoantikörper korrelieren vor allem eng mit der primär biliären Zirrhose (PBC). Bei 5 % der PBC-Patienten lassen sich jedoch mit keiner Testmethode Antikörper gegen Mitochondrien nachweisen. Mögliche Kreuzreaktionen mit Lues II-Seren konnten mit dem MASTAZYME™ AMA-M2 bislang nicht nachgewiesen werden, sollten aber im Einzelfall differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Die AMA-M2-Konzentration korreliert nicht zwingend mit dem Krankheitsstatus bzw. der Prognose; so haben z. B. Umweltfaktoren, die genetische Prädisposition oder auch chronische „Graft-versus-host“-Reaktionen Auswirkungen auf das AMA-Ergebnis.

Kein Messergebnis darf für sich allein zu einer abschließenden Diagnose verwendet werden, sondern muss immer in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Befunden interpretiert werden.

## **10. Testcharakteristika**

Die Testcharakteristika des MASTAZYME™ AMA-M2 wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

## **11. Literatur**

1. Berg PA and Klein R. Diagnose der primär-biliären Zirrhose. *In vitro* Diagnostika Nachrichten 1/1: 6–7 (1990)
2. Berg PA and Klein R. Immunology of primary biliary cirrhosis. *Ballière's Clin. Gastroenterol* 1, 675–706 (1987)
3. Fussey SPM, Guest JR, James OFW et al. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 85, 8654–8658 (1988)

	<b>Contents</b>	<b>Page</b>
1.	Intended Use	11
2.	Introduction	11
3.	Principle of the Test	12
4.	Kit Contents	12
5.	Materials Required but not Provided	13
6.	Warning and Precautions	13
7.	Storage and Stability	14
8.	Specimen Collection and Handling	14
9.	Assay Procedure	14
10.	Results and Interpretation	15
11.	Assay Performance	16
12.	References	16

## 1. Intended Use

MASTAZYME™ AMA-M2 has been designed for the detection of AMA-M2.

This assay is intended for *in vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

## 2. Introduction

### Mitochondrial Proteins

#### Antigen

Anti-mitochondrial antibodies (AMA) are a heterogeneous group of autoantibodies directed against various proteins that are located in the outer and inner membrane of mitochondria. Expression of their distinct target antigens takes place in the tissues. Non-organ specific subtypes of antibodies have been described besides those antibodies which exhibit relatively high organ specificity.

Using fluorescence techniques with tissue sections from different organs, i.e. liver, stomach, kidney, heart and pancreas, the mitochondrial autoantibodies of different specificity can be discriminated. For some of the AMA subtypes their specific target protein remains unclear. HEp 2 cell monolayers for indirect immunofluorescence AMA-M2 are characterized as a fine-speckled cytoplasmic, perinuclear condensed fluorescence pattern. For differential diagnosis of the primary biliary cirrhosis (PBC) determination of AMA-M2 by ELISA is recommended because of its high sensitivity and specificity.

Subtypes	Autoantigen	Mitochondrial localisation	Clinical Relevance
M1	Cardiolipin	inner membrane	Lues II
M2	Proteins of the $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex	inner membrane	Primary biliary cirrhosis (PBC)
M3		outer membrane	Drug-induced LE
M4	Associated with sulfite oxidase	outer membrane	PBC
M5		outer membrane	SLE and undifferentiated collagenoses, autoimmune haemolytic anaemia
M6		outer membrane	Drug induced hepatitis
M7	Sarcosin dehydrogenase	inner membrane	Cardiomyopathy, myocarditis
M8		outer membrane	PBC
M9	Associated with glycogen phosphorylase	outer membrane (probably also cytoplasmic)	PBC

#### Clinical relevance

Specific anti-mitochondrial antibodies have been described for the primary biliary cirrhosis (PBC) as subtypes M2, M4, M8 and M9. Other AMA subtypes are related to other diseases like collagenoses (AMA-M5) and drug induced LE and hepatitis (AMA-M3 and AMA-M6). The heterogeneously reacting specific anti-mitochondrial antibodies of the M2 subtype are directed against three related proteins of the  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex which is located at the inside of the mitochondrial membrane. The major epitope recognized is located on the E2 subunit and the protein X of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC). Additionally AMA-M2 recognize the (E1 und E3) subunits of the same complex

and the E2 subunit of several other multi enzyme complexes such as the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC) and the branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC).

In patients with other autoimmune diseases determination of AMA antibodies allows an early screening for the occurrence of subtype M2 and M9 antibodies which may be related with the development and / or association of PBC. Profiling the AMA subtypes allows an immunological and prognostic classification of the primary biliary cirrhosis. Early cases of symptomatic PBC often exhibit only AMA-M2 subtype (sometimes in combination with AMA-M9), whereas progressive cases and mixed syndromes with chronic acute hepatitis (CAH) are related with the occurrence of AMA-M2, -M4 and -M8 subtypes.

### 3. Principle of the Test

The principle of the test reaction can be described in four stages.

#### 3.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to the antigens on the solid phase to form a stable immune complex. After a 30 minutes incubation at room temperature the wells are washed with pre-diluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

#### 3.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After a 30 minutes incubation at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with washing buffer.

#### 3.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and subsequently the colour development is stopped after 15 minutes incubation at room temperature by adding 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to the wells. The change in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

#### 3.4 Reading and interpretation

The intensity of the colour is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

### 4. Kit Contents

The kits contain sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. The strips and solutions have to be stored at 2–8 °C. The expiry date is mentioned on the labels.

12	Microtiter strips	single strips each with 8 break-apart wells coated with pyruvate dehydrogenase
1 x	Frame holder	
6 x 1,5 mL	Calibrators 1–6	human plasma containing antibodies to mitochondrial antigen (AMA-M2), diluted in buffer, ready to use

	AMA-M2 concentration [U/mL]
Calibrator 1	1
Calibrator 2 (Cut-off)	15
Calibrator 3	25
Calibrator 4	50
Calibrator 5	100
Calibrator 6	200

1 x 150 µL	Positive Control	human plasma containing antibodies to mitochondrial antigen (AMA-M2), neat, to be diluted 1:101
1 x 150 µL	Negative Control	human plasma free of AMA-M2, neat, to be diluted 1:101
2 x 60 mL	Sample diluent	PBS solution contains preservative, ready to use
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG, ready to use
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use
1 x 12 mL	Stopping solution	1 N sulfuric acid, ready to use
2 x 50 mL	Washing buffer 10 x concentrated	PBS/Tween buffer solution 10x concentrated to be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for a short time to avoid any crystals

## 5. Materials required but not provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipettes
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter Plate Washer (in case of manual washing: wash bottle)
- Reagent tubes for the serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of higher quality

## 6. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest or swallow! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera and plasma or buffers based upon have been tested to HBsAg, HIV and HCV respectively with generally accepted methods and were found negative. Nevertheless, precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18–24 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination separate disposable pipet tips have to be used.
- No reagents from different kit lots should be used and they should not be mixed with one another.
- All reagents have to be used within shelf life.

- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or reading (ELISA Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents especially the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided because possible irritations and acid burns could arise and there exists a danger of intoxication.

## 7. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted washing buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C.

The opened kit should be used within three months.

## 8. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood which is aseptically drawn by venipuncture after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days. They should be kept at -20 °C for a longer storage. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, haemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera must be pre-diluted 1:101 in sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent) prior to testing.

## 9. Assay Procedure

Dilute controls and patient samples 1:101 with sample diluent before testing. For example pipette 10 µL of sample to 1,000 µL of sample diluent in a suitable tube.

**Controls are not pre-diluted and must therefore be diluted 1:101 before use!**

### 9.1. Preparation of Reagents

**Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.**

**Washing buffer:** Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 50 mL buffer concentrate + 450 mL distilled water). Mix thoroughly.

**Controls:** Dilute controls (1:101) as for samples with sample diluent

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. Any changes or modifications are within the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Put the unused microtiter strips back in the plastic bag and store them dry at 2–8 °C.

## 9.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for calibrators, controls and samples.

**Note: Other incubation conditions might be possible. In case of modifications of the recommended test procedure (e.g. incubation temperature 37 °C instead of RT) the user has to validate assay performance.**

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples, ready to use calibrators and diluted (1:101) controls into the appropriate wells.
2. Incubate the plate at room temperature for 30 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Incubate the strips for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
7. Dispense 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Incubate for 15 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended.

**The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.**

## 10. Results and Interpretation

### Qualitative

Calibrator 2 or calibrator 3 can be used for qualitative interpretation of the assays, depending on specificity requirements to include or eliminate borderline results. A quantitative interpretation is not possible by using calibrator 2 or 3 only.

### Quantitative

A standard curve is plotted by entering the mean absorbance of each calibrator on the Y-axis and the corresponding concentration on the X-axis using either log/log or linear/log graph paper. The concentration of the controls and specimen can then be read directly from the graph.

The calculation of the results can also be performed using a computer and a suitable software program. In this case the results are calculated using a 4 parameter fit algorithm.

### Suggested normal values

In a normal range study using serum samples from healthy blood donors and disease-state sera the following normal and elevated ranges have been established.

Negative:	< 15	U/mL
Borderline	15–25	U/mL
Positive:	> 25	U/mL

## **Recommendation**

Each laboratory should establish its individual normal ranges based on results obtained from the local population.

## **Interpretation of results**

MASTAZYME™ AMA-M2 detects antibodies directed against the E2 subunit of the mitochondrial dehydrogenase complex. Autoantibodies reacting with 70 kd, 50 kd and 42 kd antigens of pyruvate-dehydrogenase located in the inner mitochondrial membrane give positive results. There is a strong correlation between the prevalence of AMA-M2 and primary biliary cirrhosis; within 5 % of PBC patients no AMA can be detected with any of the widely used diagnostic tools.

No cross-reactivity was found between MASTAZYME™ AMA-M2 and sera derived from second stage syphilis patients but should be considered for differential diagnostic reasons.

Anti mitochondrial antibody concentrations do not correlate with stage of disease or prognosis. Environmental factors, genetical predispositions or chronic graft versus host disease may lead to elevated antibody levels.

Results are affected by several patient factors. Clinical diagnosis and disease prognosis should not be based on a single result. Other lab data and clinical observations must be taken into consideration before a conclusive diagnosis can be made.

## **11. Assay Performance**

The assay characteristics of the MASTAZYME™ AMA-M2 have been established and assessed according to the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

## **12. References**

4. Berg PA and Klein R. Diagnose der primär-biliären Zirrhose. In vitro Diagnostika Nachrichten 1/1: 6–7 (1990)
5. Berg PA and Klein R. Immunology of primary biliary cirrhosis. Ballière's Clin. Gastroenterol 1, 675–706 (1987)
6. Fussey SPM, Guest JR, James OFW et al. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 85, 8654–8658 (1988)



<b>Sommaire</b>	<b>Page</b>
1. Domaine d'utilisation	18
2. Introduction	18
3. Principe du test	19
4. Composition du coffret	20
5. Matériel nécessaire mais non fourni	20
6. Précautions d'utilisation	21
7. Conservation et stabilité	21
8. Prélèvement et transport des échantillons	21
9. Procédure ELISA	22
10. Résultats et interprétation	23
11. Performances du test	23
12. Bibliographie	24

## 1. Domaine d'utilisation

MASTAZYME AMA-M2 est destiné à la détection des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes mitochondriaux M2, dans le sérum et le plasma.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

## 2. Introduction

### Protéines mitochondriales

#### Antigène

Les anticorps dirigés contre les mitochondries (AMA) forment un groupe hétérogènes d'anticorps dirigés contre des protéines variées de la membrane interne et externe mitochondriale. L'expression de leurs antigènes cibles distincts se produit dans les tissus. Des sous types d'anticorps spécifiques non organisés ont été décrits parallèlement aux anticorps ayant une spécificité organique relativement élevée.

Les anticorps mitochondriaux de différentes spécificités peuvent être discriminés en immunofluorescence sur différents tissus (foie, estomac, rein, cœur et pancréas). Certains sous types d'anticorps AMA n'ont pas encore de cible clairement identifiée. Les anticorps AMA-M2 donnent une fluorescence cytoplasmique finement mouchetée et périnucléaire dense des cellules Hep2. La recherche des anticorps AMA-M2 par ELISA est fortement recommandée pour le diagnostic différentiel de la cirrhose biliaire primitive (CBP) à cause de la sensibilité et spécificité élevées de cette méthode.

Sous types	Autoantigènes	Localisation	Intérêt clinique
M1	Cardiolipine	Membrane interne	Lues II
M2	Protéines du complexe acide $\alpha$ -céto déhydrogénase	Membrane interne	Cirrhose biliaire primitive (CBP)
M3		Membrane externe	LE médicamenteux
M4	Associés avec la sulfite oxydase	Membrane externe	CBP
M5		Membrane externe	LED et collagénose indifférenciées, anémie hémolytique auto-immune
M6		Membrane externe	Hépatite médicamenteuse
M7	Sarcosine déhydrogénase	Membrane interne	Cardiomyopathies, myocardites
M8		Membrane externe	CBP
M9	Associés avec la glycogène phosphorylase	Membrane externe (probablement aussi-cytoplasmatique)	CBP

### Intérêt clinique

Les sous types M2 , M4 , M8 et M9 ont été décrits comme des anticorps anti-mitochondries de la cirrhose biliaires primitive (CBP). Les autres sous types sont spécifiques d'autres maladies comme les collagénoses (AMA-M5) and drug induced LE and hepatitis (AMA-M3 and AMA-M6). Les anticorps anti AMA de type 2 sont spécifiquement dirigés contre trois protéines du complexe  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase de la membrane interne mitochondriale. L'épitope majeur reconnu est situé dans la sous unité E2 et la protéine X du complexe pyruvate déshydrogénase (CPD). De plus les anticorps anti-M2 reconnaissent les sous unités E1 et E3 de ce complexe et la sous unité E2 de plusieurs autres complexes enzymatiques comme le complexe 2-oxoglutarate déshydrogénase (COGD) et la chaîne branchée du complexe 2-oxo acide déshydrogénase (BCOADC).

Chez les patients ayant d'autres maladies autoimmunes, la détermination des anticorps anti-AMA permet un dépistage précoce de l'occurrence des anticorps spécifiques des sous types M2 et M9 pouvant être associés ou non au développement de la CPB. Le profil des sous types d'anticorps anti-AMA-M2 permet une classification immunologique et un pronostic de CPB. Des cas de CPB symptomatique précoce présente uniquement des anti-M2 combiné parfois avec des anti-M9. D'autres cas progressifs et de syndrome mixtes avec une hépatite chronique aiguë sont décrits avec la présence des sous types M2, M4 et M8.

### **3. Principe du test**

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

#### **3.1 Incubation des sérums**

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage pré diluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

#### **3.2 Incubation du conjugué**

Le conjugué anti-IgG humaines marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgG des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage.

#### **3.3 Réaction du substrat et de la solution d'arrêt**

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppé après 15 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) 1 N dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

#### **3.4 Lecture et interprétation**

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique: 600–690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

#### 4. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 2–8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12 x	barrettes de microtitration	barrettes sécables de 8 puits coatées avec l'antigène purifié de dsDNA plasmidique
1 x	Cadre de microplaque	
6 x 1,5 mL	Calibrateur dsDNA	Plasma humains contenant des anticorps anti-AMA-M2 dilués en tampon, prêts à l'emploi.

	AMA-M2 concentration [U/mL]
Calibrateur 1	1
Calibrateur 2 (Seuil)	15
Calibrateur 3	25
Calibrateur 4	50
Calibrateur 5	100
Calibrateur 6	200

1 x 150 µL	Contrôle positif	Plasma humains contenant des anticorps anti AMA-M2 purifiés, à diluer au 1:101
1 x 150 µL	Contrôle négatif	Plasma humains exempt de AMA-M2, pur, à diluer au 1:101.
2 x 60 mL	Diluant d'échantillon	Solution tampon avec du PBS comme conservateur, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Conjugué	Conjugué HRP de chèvre anti-IgG humaines, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Substrat TMB	3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine, prêt à l'emploi.
1 x 12 mL	Solution Stop	Acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi.
2 x 50 mL	Solution de lavage concentrée 10 x	Solution tampon PBS/Tween concentrée 10X à diluer au 1:10 avant utilisation; la solution concentrée peut être chauffée à 37°C pour éviter la formation de cristaux.

#### 5. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5 µL, 100 µL et 500 µL
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600–690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel: pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

## 6. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex: eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18–24 °C) avant de commencer le test.
- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Eviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaque soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs. Eviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouverts le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas interchanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Eviter le contact de la solution stop et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.

## 7. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2–8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2–8 °C.

Une fois ouvert le kit doit être utilisé dans les 3 mois.

## 8. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 3 jours à 2–8°C. Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyper lipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être pré dilués au 1:101 dans le diluant des sérums (ex: 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

## 9. Procédure ELISA

Diluer les contrôles et les échantillons de patients au 1 :101 avec le diluant d'échantillon avant de tester. Par exemple, déposer 10 µL d'échantillon dans 1000 µL de diluant d'échantillon dans un tube adapté.

**Les contrôles ne sont pas pré dilués et doivent être dilués au 1:101 avant utilisation!**

### 9.1. Préparation des réactifs

**Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18–24°C) avant utilisation et bien les mélanger.**

**Solution de lavage:** Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37°C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au **1:10 avec de l'eau distillée** (ex: 50 mL de solution de lavage concentrée + 450 mL d'eau distillée). Mélanger minutieusement.

**Contrôles:** Diluer les contrôles comme les échantillons avec le diluant d'échantillon.

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.
- Conserver les barrettes non utilisées dans leur sac plastique à 2–8 °C.

### 9.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour le calibrateur, les contrôles et les échantillons.

**Remarque: D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex: incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.**

1. Déposer 100 µL de chaque échantillon dilué (1:101), de calibrateurs et de contrôles prédilués (1:101) dans les puits appropriés.
2. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 30 minutes.
3. Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
4. Déposer 100 µL de conjugué dans chaque puits.
5. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Eliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
7. Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
8. Incuber la microplaque pendant 15 minutes dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.

- Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et lire la densité optique à 450 nm. Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600–690 nm est recommandée.

**La couleur est stable pendant au moins 30 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.**

## 10. Résultats et interprétation

### Test qualitatif

Le Standard 3 ou 2 (seuil des positifs) peut être utilisé pour une interprétation qualitative des résultats. Ne pas utiliser les standard N°2 ou N°3 seuls pour une interprétation quantitative.

### Test quantitatif

Tracer la courbe d'étalonnage sur papier log/log ou lin/log en rapportant sur l'axe des Y la moyenne des DO de chaque standard et sur l'axe des X les concentrations inscrites sur les flacons. La concentration des échantillons testés est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage. Les calculs des concentrations peuvent être automatiquement rendus grâce à un logiciel d'interprétation utilisant une courbe à 4 paramètres.

### Valeurs normales suggérées

Une étude portant sur des échantillons de donneurs sains et des sérums de malades connus a donné les résultats suivants :

Négatif < 15 U/ml

Douteux: 15-25 U/ml

Positif > 25 U/ml

### Recommandation

Chaque laboratoire devrait établir les valeurs normales à partir des résultats obtenus dans sa population locale.

### Interprétation des résultats

MASTAZYME AMA M2 détecte les anticorps dirigés contre la sous unité E2 du complexe déshydrogénase. Les anticorps réagissant avec les antigènes de 70kd, 50 kd et 42 kd de la pyruvate déshydrogénase située dans la membrane interne mitochondriale donnent des résultats positifs. Il y a une corrélation très forte entre le prévalence en anticorps anti-M2 et la CBP. Environ 5 % des patients ayant une CBP ne présente pas d'anticorps mitochondriaux par les méthodes diagnostiques usuelles.

Les concentrations d'anticorps mitochondriaux ne corréleront pas avec le stade de la maladie ou le pronostic. Les facteurs d'environnement, les prédispositions génétiques ou la greffe par rapport à la maladie de l'hôte peuvent donner des titres élevés.

Les résultats peuvent être affectés par différents facteurs propres au sérum testé. Le diagnostic clinique et le pronostic de la maladie ne peuvent se baser sur un seul test de laboratoire. D'autres tests et des observations cliniques doivent être effectués avant de poser un diagnostic définitif.

## 11. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME AMA-M2 ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale

## 12. Bibliographie

1. Berg PA and Klein R. Diagnose der primär-biliären Zirrhose. *In vitro Diagnostika Nachrichten* 1/1: 6–7 (1990)
2. Berg PA and Klein R. Immunology of primary biliary cirrhosis. *Ballière's Clin. Gastroenterol* 1, 675–706 (1987)
3. Fussey SPM, Guest JR, James OFW et al. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 85, 8654–8658 (1988)



**Notizen / Notes / Note:**

**Notizen / Notes / Note:**

**Notizen / Notes / Note:**

**Hersteller / Manufactured by:**  
**Fabriqué par:**

**MAST DIAGNOSTICA**  
Laboratoriumspräparate GmbH  
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld  
Deutschland  
Tel.: +49 4533 2007-0  
Fax: +49 4533 2007-68  
www.mastgrp.com  
mast@mast-diagnostica.de

**Distributed by:**

**MAST GROUP Ltd.**  
MAST House, Derby Road, Bootle  
UK-Mersey Side L20 1EA  
Great Britain  
Phone: +44 151 933 7277  
Fax: +44 151 944 1332  
www.mastgrp.com  
sales@mastgrp.com

**Distribué par:**

**MAST DIAGNOSTIC**  
115, Rue Jules Barni  
80000 Amiens  
France  
Tél.: + 33 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 3 22 80 99 22  
www.mastgrp.com  
service-commercial@mast-diagnostic.fr