

# MASTAZYME™ AMA-M2

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen mitochondriales Antigen (AMA-M2) in Serum und Plasma

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

Test immunoenzymatique pour détection des anticorps anti-mitochondries M2 dans le sérum et le plasma humain

## Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



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



Deutsch:            Seiten 03–08



English:            Pages 09–14



Français:           Pages 15–20

MASTAZYME™ AMA-M2

REF 733017






12 x 8 Tests

**Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C**

**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>1-4</b>	Kalibrator 1-4	Calibrator 1-4	Calibrateur 1-4
<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>		Stopp-Lösung	Stopping solution	Solution d'arrêt
<b>WASH</b>	<b>CONC</b>	Waschpuffer, konzentriert	Washing buffer, concentrate	Solution de lavage, concentrée
<b>LOT</b>		Charge	Batch	Lot
		Gebrauchsinformation beachten	Read instructions for use	Lire la notice d'utilisation
		Wichtige Hinweise beachten	Important notes	Remarque importante
		Verfallsdatum	Expiry Date	Date de péremption
		Lagerung bei	Storage	Conservation
		Reagenzien nicht zur Wiederverwendung geeignet	Reagents not reusable	Ne pas réutiliser les réactifs

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

## 1. Verwendungszweck

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

## 2. Testprinzip

Das Testprinzip der ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

### 2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit Antigenen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 30-minütigen 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 30-minütigen 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 0,5 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

Das Testkit enthält genügend Reagenzien für 12 x 8 = 96 Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet mit AMA-M2 Antigenen
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
4 x 1,5 mL	Kalibratoren 1–4	Stabilisiertes humanes Plasma, enthält antigenspezifische Antikörper, gebrauchsfertig

	Anti-AMA-M2 Konzentration [U/mL]
Kalibrator 1	1
Kalibrator 2 (Cut-off)	25
Kalibrator 3	50
Kalibrator 4	200
Positive Kontrolle	100
Negative Kontrolle	15

1 x 1,5 mL	Negative Kontrolle	Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden
1 x 1,5 mL	Positive Kontrolle	Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden
2 x 60 mL	Probenverdünnungspuffer	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	0,5 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, evtl. 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 Labogeräte 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 Verfalldatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden. Er muss allerdings vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht 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. Vorbereitung der Reagenzien

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.

- 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.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MP-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, gebrauchsfertigen Kalibratoren und 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 stehenlassen.
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 wird der Kalibrator 2 verwendet. Eine Quantifizierung nur unter Verwendung des Cut-off-definierenden Kalibrators ist nicht möglich.

### Quantitativ

Die Konzentration der Patientenproben wird mit gängigen Computerprogrammen berechnet. Für die Berechnung der Kalibrationskurve ist z. B. die 4-Parameter-Anpassung geeignet.

Optional: Die Extinktionswerte der 4 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.

### Grenzwerte

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

negativ: < 25 U/mL

positiv: > 25 U/mL

## **Interpretation der Ergebnisse**

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.

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. 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.

## **10. Testcharakteristika**

Die Testcharakteristika des MASTAZYME™ AMA-M2 ELISAs 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	10
2. Principle of the Test	10
3. Kit Contents	10
4. Materials Required but not Provided	11
5. Warnings and Precautions	11
6. Storage and Stability	12
7. Specimen Collection and Handling	12
8. Assay Procedure	12
9. Results and Interpretation	13
10. Assay Performance	14
11. References	14

## 1. Intended use

MASTAZYME™ AMA-M2 ELISA has been designed for the detection and quantification of specific antibodies against AMA-M2 respectively in serum and plasma.

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

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other findings. Clinical judgement and additional tests should also be taken into account.

## 2. Principle of the Test

The ELISA test can be described in four stages:

### 2.1 Serum incubation

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

### 2.2 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 incubating for 30 minutes at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with wash buffer.

### 2.3 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 consequent colour development is stopped after a 15 minute incubation at room temperature by adding 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to the wells. The shift in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

### 2.4 Reading and interpretation

The colour intensity 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.

The results can be read from a calibration curve or with an electronic graphing package using a 4 parameter sigmoidal curve.

## 3. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. Kit components should be stored at 2–8 °C. The expiry date is shown on the individual labels.

12	Microtiter strips	Single strips each with 8 break-apart wells coated with purified AMA-M2 respectively.
1 x	Frame holder	
4 x 1,5 mL	Calibrators 1–4	Stabilized human plasma containing antibodies against the above antigens and pre-diluted in buffer. Ready to use (RTU).

	Anti-AMA-M2 Concentration [U/mL]
Calibrator 1	1
Calibrator 2 (Cut-off)	25
Calibrator 3	50
Calibrator 4	200
Positive control	100
Negative control	15

1 x 1,5 mL	Negative control	Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve.
1 x 1,5 mL	Positive control	Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve.
2 x 60 mL	Sample diluent	PBS solution with 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	0.5 N sulfuric acid, ready to use.
2 x 50 mL	Wash 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 15 min to dissolve any crystals

#### 4. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micropipettes and a multichannel pipette (optional).
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter plate washer (if washing manually: wash bottle)
- Reagent tubes for serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of similar or better quality

#### 5. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera, plasma and buffers containing human biological material were found to be negative for Hepatitis B, C and HIV. Nevertheless, precautions such as the use of latex gloves must be taken.
- Serum and reagent spills should be cleaned with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and the refuse disposed of appropriately.
- All reagents should be brought to room temperature (18 to 24 °C) before starting the test procedure.
- Before pipetting, all reagents should be mixed thoroughly by gentle agitation. Vigorous shaking leading to formation of foam should be avoided.
- It is important to pipette with constant time intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same reaction conditions.
- When pipetting reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Furthermore, disposable pipette tips are strongly recommended to avoid cross-contamination. The contents of the bottles are usually sensitive to oxidation so should be opened only for a short time.
- To avoid cross contamination single use pipet tips should be used
- No reagents from different kit batches should be used and reagents should not be mixed with one another.

- All reagents should be used within the listed shelf life.
- In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or measurement (ELISA Reader) instrumentation.
- Certain reagents (especially the stop solution and substrate) are irritants- avoid contact with skin, eyes and mucosal membranes. In case of accident, rinse with water and seek medical attention. Clean all equipment after use to avoid secondary contact incidents.

## 6. 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 wash buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C. However ensure that this is at room temperature before testing.

Kits should be used within three months of opening.

## 7. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for testing. Samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days, although for longer storage periods they should be aliquoted and kept at -20 °C. Repeated freezing and thawing is contra-indicated. Lipaemic, haemolytic, icteric and bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera should be prediluted 1:101 in sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent) prior to testing.

## 8. Assay Procedure

### 8.1. 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.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. The user takes sole responsibility for any modifications to the test procedure.
- 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 calibration curve should be established with each assay for quantitative results.
- Replace any unused microtiter strips in the resealable aluminium bag provided and store under dry conditions at 2–8 °C.

## 8.2. Assay Steps

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

**Note: Other incubation conditions are possible. However in case of modifications to the recommended test procedure (e.g. an incubation temperature of 37 °C instead of RT) assay performance should be validated by the user.**

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use calibrators and controls into the appropriate wells.
2. Incubate the test plate at room temperature for 30 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Incubate the test plate for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
7. Pipette 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. Concentrations can be plotted with an electronic graphing package or by hand against the calibration curve.

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

## 9. Results and Interpretation

### Qualitative

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

### Quantitative

The results can be calculated using a computer and suitable software program. In this case the results are calculated using a 4 parameter fit algorithm to produce a sigmoidal curve.

Optional: 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.

### **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. It is recommended that each laboratory should establish its individual normal ranges based on results obtained from the local population.

negative: < 25 U/mL

positive: > 25 U/mL

### **Interpretation**

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

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.

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.

## **10. Assay Performance**

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

## **11. 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	16
2.	Principe du test	16
3.	Composition du coffret	16
4.	Matériel nécessaire mais non fourni	17
5.	Précautions d'utilisation	17
6.	Conservation et stabilité	18
7.	Prélèvement et transport des échantillons	18
8.	Procédure ELISA	18
9.	Résultats et interprétation	19
10.	Performances du test	20
11.	Bibliographie	20

## 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. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

### 2.1 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 prédilué afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

### 2.2 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.

### 2.3 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,5 N dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

### 2.4 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 spécifique d'auto-anticorps dans l'échantillon du patient.

Les résultats peuvent être obtenus à partir de la courbe de calibration ou avec un graphe utilisant une courbe sigmoïdale à 4 paramètres.

## 3. 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 AMA-M2.
1 x	Cadre de microplaque	
4 x 1,5 mL	Calibrateur dsDNA	Plasma humains contenant des anticorps anti-AMA-M2 dilués en tampon, prêts à l'emploi.

	Anti-AMA-M2 concentration [U/mL]
Calibrateur 1	1
Calibrateur 2 (Seuil)	25
Calibrateur 3	50
Calibrateur 4	200
Contrôle positif	100
Contrôle négatif	15



1 x 1,5 mL	Contrôle négatif	Plasma humain stabilisé, prêt à l'emploi, pouvant être inclus dans la courbe de calibration.
1 x 1,5 mL	Contrôle positif	Plasma humain stabilisé, prêt à l'emploi, pouvant être inclus dans la courbe de calibration.
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 0,5 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.

#### 4. 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

#### 5. 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 ouvert 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.

- Certain reagents (especially the stop solution and substrate) are irritants - avoid contact with skin, eyes and mucosal membranes. In case of accident, rinse with water and seek medical attention. Clean all equipment after use to avoid secondary contact incidents.

## 6. 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. Ramener cependant à température ambiante.

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

## 7. Prélèvement et transport des échantillons

Le plasma ( EDTA , héparine) et le sérum peuvent être utilisés pour le test. Les échantillons peuvent être conservés entre 2°C et 8°C pendant 3 jours ou répartis en aliquotes et conservés à -20 °C pour de plus longues périodes. Congélation et décongélation répétées sont contre-indiquées. Les échantillons contaminés par des bactéries, hémolytiques, hémolytiques ou lipidiques peuvent donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

Les sérums de patient doivent être dilués au 1:101 dans le diluant d'échantillon ( ex: 5µL de sérum + 500 µL de diluant d'échantillon ) avant d'être testés.

## 8. Procédure ELISA

### 8.1. 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.

- 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.

### 8.2. Test ELISA

**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 pré-dilué (1:101), de calibrateurs et de contrôles 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. Lavage comme no. 3 ci-dessus.
  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. Laisser rester pour 5 min.
  10. 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. Les concentrations peuvent être calculées automatiquement ou manuellement à partir de la courbe de calibration.
- La couleur est stable pendant au moins 30 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.

## 9. Résultats et interprétation

### Test qualitatif

Le Calibrateur 2 peut être utilisé pour l'interprétation qualitative, selon les besoins spécifiques, pour inclure ou éliminer les résultats douteux. Une interprétation quantitative n'est pas possible en utilisant seulement le Calibrateur 2.

### Test quantitatif

Les résultats peuvent être calculé par un logiciel utilisant une courbe sigmoïdale à 4 paramètres. Option: une courbe d'étalonnage est obtenu en reportant, sur un graphe en utilisant du papier log/log ou linéaire/log, la moyenne des absorbances de chaque calibrateur sur l'axe Y et la concentration correspondantes sur l'axe X. La concentration des échantillons et des contrôles peut être obtenue directement à partir du graphe.

### Valeurs normales suggérées

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

Négatif < 25 U/ml

Positif > 25 U/ml

### Interprétation

Les résultats peuvent être affectés par plusieurs facteurs liés au patient. Le diagnostic clinique et le pronostic de la maladie ne doivent pas se baser sur le résultat d'un seul test. D'autres résultats de laboratoire et observations cliniques doivent être prises en considération avant de pouvoir donner tout diagnostic final.

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 la prévalence en anticorps anti-M2 et la CBP. Environ 5 % des patients ayant une CBP ne présentent pas d'anticorps mitochondriaux par les méthodes diagnostiques usuelles.

Les concentrations d'anticorps mitochondriaux ne corrélient 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.

## 10. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME AMA-M2 ELISA 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

## 11. 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:**

**United Kingdom**

**Mast Group Ltd.  
MAST House Derby Road,  
Bootle, Mersey Side L20 1EA**

**Tel.: +44 151 933 7277  
Fax: +44 151 944 1332  
sales@mastgrp.com**



**Deutschland**

**Mast Diagnostica GmbH  
Feldstraße 20  
DÉ 23858 Reinfeld**

**Tel.: +49 4533 2007-0  
Fax: +49 4533 2007-68  
mast@mast-diagnostica.de**

**France**

**Mast Diagnostic  
115, Rue Jules Barni  
CS 91106  
80011 AMIENS CEDEX 1  
Tel.: + 33 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 3 22 80 99 22  
info@mast-diagnostic.fr**

**[www.mastgrp.com](http://www.mastgrp.com)**