

AESKULISA

AMA-M2-Check

Objednací kód:
3707

Aesku.Diagnostics

Mikroforum Ring 2, D-55234 Wendelsheim, Germany

Tel: +49-6734-9627-0 Fax: +49-6734-9627-27

www.aesku.com/diagnostics/english/index.php

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno

Tel: +420549124111

Domovská stránka: www.biovendor.cz

PRACOVNÍ

POSTUP

Pracovní postup

AESKULISA AMA-M2-Check

REF 3707

Obsah

1. Použití	2
2. Klinické využití a princip metody	2
3. Složení soupravy	2
4. Uchovávání, skladování a expirace	3
5. Upozornění	3
6. Odběr vzorků, manipulace a uchování	4
7. Postup stanovení	4
8. Kvantitativní a kvalitativní interpretace	5
9. Technická data	6
10. Charakteristika	6
11. Literatura.....	7

Příloha A : pipetovací schéma

Příloha B: pracovní postup

1. Použití

AESKULISA AMA-M2-Check je enzymoimuno-analytická souprava pro kvantitativní a kvalitativní detekci IgG a IgM protilátek proti M2 v lidském séru, využívající nativní mitochondriální antigen M2.

Tato metoda je nástrojem v diagnostice primární biliární cirhózy (PBC).

2. Klinické využití a princip metody

Primární biliární cirhóza (PBC) je chronické zánětlivé onemocnění malých a středních žlučovýchodů, které je serologicky charakterizováno přítomností cirkulujících M2 autoproti látek. Anti-M2 autoproti látky patří ke skupině antimitochondriálních protilátek (AMA). Heterogenně reagující specifické AMA protilátky podtřídy M2 jsou namířeny proti třem příbuzným proteinům komplexu dehydrogenázy alfa-ketokyselin, který je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně. Nejdůležitější známý epitop se nachází na E2 podjednotce a proteinu X komplexu pyruvát dehydrogenázy (PDC). Autoproti látky AMA-M2-Check navíc rozeznávají E1 α a E1 β podjednotky téhož komplexu, a E2 podjednotku několika dalších multienzymových komplexů, jako např. komplexu 2-oxo-glutarát dehydrogenázy (OGDC) a rozvětveného řetězce komplexu dehydrogenázy 2-oxo kyselin (BCOADC).

Stanovení AMA-M2-Check je významným nástrojem v diagnostice PBC.

Princip stanovení

Vzorky séra ředěné 1:101 jsou inkubovány na mikrotitračních destičkách v jamkách pokrytých specifickým antigenem. Jsou-li ve vzorku séra pacienta přítomny protilátky, naváží se na antigen. Jejich nenavázaná frakce se v následujícím kroku vymyje. Poté je přidán konjugát (protilátka proti lidskému imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou), vzorek inkubován a dojde k reakci s komplexem antigen-protilátka, vzniklém v mikrodestičce v předchozím kroku. Nenavázaný konjugát je v dalším kroku vymyt. Přídavek roztoku substrátu TMB (tetramethylbenzidin) vede k enzymatické kolorimetrické reakci (modrá barva), která je zastavena přidáním zředěné kyseliny (barva se změní na žlutou). Intenzita barvy vzniklé z chromogenu je přímo úměrná množství konjugátu vázaného na komplex antigen-protilátka a potažmo množství původní koncentrace příslušných protilátek ve vzorku zkoumaného séra.

3. Složení soupravy (kitu)

Nutno připravit před použitím:

5x ředící roztok 1 lahvička, 20 ml – 5x koncentrovaný (bílé víčko: žlutý roztok)
Obsahuje: Tris, NaCl, BSA, azid sodný < 0,1 (konzervans)

50x promývací roztok 1 lahvička, 20 ml – 50x koncentrovaný (bílé víčko, zelený roztok)
Obsahuje: Tris, NaCl, Tween 20, azid sodný < 0,1% (konzervans)

Připravené k použití:

Negativní kontrola 1 lahvička, 1,5 ml (zelené víčko, bezbarvý roztok)
Obsahuje: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)

Pozitivní kontrola 1 lahvička, 1,5 ml, (červené víčko, žlutý roztok)
Obsahuje: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)

Cut off kalibrátor 1 lahvička, 1,5 ml, (modré víčko, žlutý roztok)
Obsahuje: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)

Kalibrační roztoky 6 lahviček, po 1,5 ml, 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml
(žluté roztoky, intenzita barvy roste s koncentrací roztoku)
Obsahují: lidské sérum (ředěné), azid sodný < 0,1% (konzervans)

Konjugát 1 lahvička, 15 ml IgG/IgM (bílé víčko, červený roztok)
Obsahuje: protilátky proti lidskému imunoglobulinu konjugované s křenovou peroxidázou

Roztok substrátu TMB	1 lahvička, 15 ml (černé víčko) Obsahuje: stabilizovaný TMB/H ₂ O ₂
Stop činidlo	1 lahvička, 15 ml (bílé víčko, bezbarvý roztok) Obsahuje: 1M kyselina chlorovodíková
Mikrotitrační deska	12x8 jamek v oddělitelných prouzcích Pokrytí jamek viz. bod 1

Jako konzervans je použit azid sodný (T+, R 28 – 32, S ½ - 28 – 45).

Další potřebný materiál (nedodávaný se soupravou)

Přístroj na měření absorbancí mikrotitračních destiček (reader) s filtrem 450 nm, a volitelným 620 nm referenčním filtrem (600-690 nm). Laboratorní sklo (odměrný válec 100-1000 ml), zkumavky pro ředění roztoků. Vortex, pipety s přesností 10, 100, 200, 500, 1000 µl nebo multikanálová pipeta 100-1000 µl. Přístroj na promývání mikrotitračních destiček (300 µl opakovaní nebo multikanálová pipeta nebo automatický systém), adsorbční papír.

Naše testy jsou vyrobeny k použití s purifikovanou vodou odpovídající definici Pharmacopeia USA (USP 26-NF 21) a European Pharmacopeia (Eur. Ph. 4th Ed.).

4. Uchovávání, skladování, expirace

Všechny reagenty a mikrotitrační destičku uchovávejte v originálních obalech při teplotě 2-8 °C. Rekonstituované (rozpuštěné připravené roztoky) jsou při teplotě 4 °C stabilní minimálně 1 měsíc. **Reagenty a mikrotitrační destičky by měly být používány pouze do vypršení expirace, uvedené na každé komponentě. Vyhněte se intenzivní expozici roztoku substrátu TMB světlem. Uchovávejte mikrotitrační destičky v originální fólii včetně desikantu, fólii vždy neprodyšně uzavřete (zalepte).**

5. Upozornění

5.1 Zdravotní rizika

Tento produkt je určen **POUZE PRO POUŽITÍ IN VITRO**. Se soupravou by měl pracovat pouze personál odborně způsobilý a speciálně vyškolený v manipulaci s diagnostickými metodami IN VITRO. Ačkoli tento produkt není za normálních podmínek používání považován za přímo škodlivý nebo nebezpečný, k zajištění maximální bezpečnosti přečtěte následující text:

Doporučení a bezpečnostní opatření

Tato souprava obsahuje potenciálně nebezpečné komponenty. Přestože reagenty soupravy nejsou klasifikovány jako dráždivé vůči očím a kůži, doporučujeme vyhnout se jejich kontaktu s očima a kůží a při práci používat jednorázové rukavice. **POZOR!** Kalibrátory, kontroly a pufrů obsahují azid sodný (NaN₃) jako konzervans. NaN₃ může být toxický při požití nebo při potřísnění kůže nebo proniknutí do očí. NaN₃ může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vytvoření vysoce výbušných kovových azidů. Při likvidaci promyjte odpad proudem vody kvůli zabránění jejich vzniku. Prosíme řiďte se pokyny pro dekontaminaci dle CDC nebo jiných místních/národních pravidel.

Nekuřte, nejezte a nepijte, pracujete-li se soupravou.

Nepipetujte ústy.

Veškerý materiál lidského původu použitý pro výrobu této soupravy (kontroly, standardy atd.) byl schválenými metodami testován a potvrzen negativním na HbsAg, Hepatitis C a HIV 1. Nicméně žádný test nemůže garantovat úplnou absenci virových agens v takovýchto materiálech. Proto zacházejte s kontrolami, standardy a vzorky sér pacientů jako s potenciálně infekčními materiály v souladu s platnými předpisy.

5.2 Obecná pravidla pro použití soupravy

Nesměšujte a nenahrazujte reagenty nebo mikrotitrační destičky s odlišnými čísly šarže.

Pro optimální výkonnost testu umožněte všem komponentám dosáhnout před použitím pokojové teploty (20-32 °C), dobře promíchejte a dodržujte doporučené inkubační schéma.

Inkubace: U automatizovaných systémů doporučujeme test provádět při 30 °C.

Nikdy nevystavujte komponenty teplotám vyšším než 37°C.

Při pipetování roztoku substrátu vždy používejte nové nepoužité špičky. Chraňte toto reagens před světlem. Nikdy nepipetujte konjugát špičkou použitou dříve s jinou reagenty.

Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena pouze na výsledcích provedených testů, ale měla by být stanovena lékařem po zhodnocení všech klinických a laboratorních nálezů.

6. Odběr vzorku, manipulace a uschovávání

Používejte přednostně čerstvě získané vzorky séra. Odběr krve musí být proveden podle platných předpisů.

Nepoužívejte ikterické, lipemické, hemolyzované nebo bakteriemi kontaminované vzorky. Séra s obsahem částic by měla být vyčištěna nízkorychlostním odstředěním (<1000 x g). Vzorky krve by měly být odebrány do čistých, suchých a prázdných zkumavek. Po separaci by sérum mělo být ihned použito, případně uschováno v těsně uzavřené zkumavce při teplotě 2-8 °C max. 3 dny, pro delší uschování pak zamraženo na teplotu -20 °C.

7. Postup stanovení

7.1 Přípravy před pipetováním

Nařeďte koncentrované reagenty

Nařeďte koncentrovaný ředící roztok 1:5 destilovanou vodou (např. 20 ml + 80 ml).

Nařeďte koncentrovaný promývací roztok 1:50 destilovanou vodou (např. 20 ml + 980 ml).

Vzorky

Nařeďte vzorky sér 1:101 s ředícím roztokem (1x) (např. 1000 µl ředícího roztoku (1x) + 10 µl séra. Dobře promíchejte !!

Promývání

Připravte 20 ml naředěného promývacího roztoku (1x) pro 8 jamek, nebo 200 ml pro 96 jamek (např. 4 ml koncentrátu + 196 ml destilované vody).

Automatické promývání:

Zvažte nadbytečný objem požadovaný pro nastavení přístrojů a mrtvý objem robotické pipety.

Manuální promývání:

Slijte tekutinu z jamek obrácením destičky. Energicky poklepejte rámem destičky s jamkami obrácenými dolů na čistý adsorbční papír. Napipetujte 300 µl naředěného promývacího roztoku do každé jamky a počkejte 20 sekund. Opakujte celý postup ještě dvakrát.

Mikrodestičky

Zjistěte počet jamek nezbytný pro provedení testu. Odstraňte nevyužité jamky z rámu, pro uschování je umístěte do poskytnutého plastického obalu spolu s desikantem, v něm neprodyšně zalepte a uchovejte při teplotě 2-8 °C.

7.2 Pracovní postup

Pipetovací schéma je vyobrazeno v příloze A, pracovní postup v příloze B.

Doporučujeme vzorky a kalibrátory testovat v duplikátu.

Cut-off kalibrátor je určen pouze pro kvalitativní testování.

- Napipetujte 100 µl zředěného séra od každého pacienta do připravených jamek.
- Napipetujte 100 µl kalibračních roztoků NEBO cut-off kalibrátoru a negativních a pozitivních kontrol do připravených jamek.
- Inkubujte 30 minut při teplotě 20-32 °C.
- Promyjte 3x s 300 µl promývacího roztoku (naředěného 1:50).
- Napipetujte 100 µl konjugátu do každé jamky.
- Inkubujte 30 minut při teplotě 20-32 °C.
- Promyjte 3x s 300 µl promývacího roztoku (naředěného 1:50).
- Napipetujte 100 µl roztoku substrátu TMB do každé jamky.
- Inkubujte v temnu 30 minut při teplotě 20-32 °C.
- Napipetujte 100 µl stop činidla do každé jamky za použití stejného postupu, jako při pipetování substrátu.
- Inkubujte minimálně 5 minut.
- 5 sekund opatrně protřepávejte destičku.
- Změřte absorbance při vlnové délce 450 nm (volitelně 450/620 nm) do 30 minut po předchozím kroku.

8. Kvantitativní a kvalitativní interpretace

Pro kvantitativní interpretaci sestrojte křivku vedenou průsečíky bodů vzniklých vynesemím hodnot **OD (optické denzity)**, získaných měřeními každého kalibračního roztoku na osu **Y** a korespondujících hodnot koncentrací kalibračních roztoků (**U/ml**), které leží na ose **X**. Pro dosažení optimálních výsledků doporučujeme použít log/lin funkce nebo 4-parametrové funkce. Z OD každého zkoumaného vzorku zjistěte korespondující koncentraci protilátek vyjádřenou v **U/ml**.

Normální rozmezí	Nerozhodný výsledek	Pozitivní výsledek
< 16 U/ml	16-24 U/ml	>24 U/ml

Příklad standardní křivky

Doporučujeme pipetování kalibračních roztoků pro každé měření v dubletech.

Kalibrátory IgG/M	OD 450/620 nm	CV %
0 U/ml	0.032	2.8
3 U/ml	0.152	2.6
10 U/ml	0.281	1.2
30 U/ml	0.646	2.4
100 U/ml	1.214	1.7
300 U/ml	2.104	1.6

Příklad výpočtu

Pacient	opakování (OD)	průměr (OD)	Výsledek (U/ml)
P 01	0.794/0.792	0.793	45.4
P 02	1.453/1.477	1.465	135.8

Údaje o každé jednotlivé šarži jsou přiloženy v letáku o kontrole kvality. Laboratoře mohou provádět vlastní kontrolu kvality používáním vlastních kontrol a/nebo interních směsných sér, jak uvádějí směrnice EU.

Nepoužívejte tento příklad pro interpretaci výsledků vyšetření vzorků Vašich pacientů !!!

Každá laboratoř by měla stanovit své vlastní referenční rozmezí odvozené od jejich vlastních technik, kontrol, vybavení a populace pacientů s ohledem na její vlastní zavedené postupy.

Pro **kvalitativní interpretaci** zjistěte optickou densitu cut-off kalibrátoru a vzorků pacienta. Srovnajte OD vzorků pacienta s OD cut-off kalibrátoru. Pro kvalitativní interpretaci doporučujeme všechna séra v rozmezí 20 % okolo hodnoty cut-off brát jako nerozhodná. Všechny vzorky, jejichž OD je vyšší než toto rozmezí, jsou považovány za pozitivní, vzorky s OD nižší jsou považovány za negativní.

Negativní: OD pacient < 0.8 x OD cut-off

Šedá zóna: 0.8 x ODcut-off ≤ OD pacient ≤ 1.2 x ODcut-off

Pozitivní: OD pacient > 1.2 x OD cut-off

9. Technická data

Vyšetřovaný materiál:	sérum
Objem vzorku:	10 µl vzorku naředěného 1:101 s 1x ředícího roztoku
Celková inkubační doba:	90 minut při teplotě 20-32 °C
Kalibrační rozmezí:	0-300 U/ml
Mez stanovitelnosti:	1,0 U/ml
Uchovávání:	při 2-8 °C, používejte pouze originální lahvičky

10. Charakteristika

10.1 Analytická citlivost

Testováním ředícího pufru (30x) na AESKULISA AMA-M2-Check byla analytická citlivost této soupravy stanovena na 1,0 U/ml.

10.2 Specifičnost a senzitivita

Mikrodestičky jsou pokryty vysoce čištěným **mitochondriálním M2 antigenem**. Nebyla zjištěna zkřížená reaktivita s ostatními autoantigeny. Anti-M2 autoprotilátky jsou pro primární biliární cirhózu specifické (Berg et al., 1982) a byly nalezeny u 96 % pacientů s PBC..

10.3 Linearita

Touto soupravou byla testována vybraná séra, přičemž byla zjištěna lineární korelace. Nicméně vzhledem k heterogenní povaze lidských autoprotilátek mohou existovat vzorky, které se nebudou chovat v souladu s tímto principem.

Vzorek č.	Diluční faktor	Naměřená koncentrace (U/ml)	Předpokládaná koncentrace (U/ml)	Výtěžek (%)
1	1 / 100	154.0	157.0	98.1
	1 / 200	77.0	78.5	98.1
	1 / 400	40.8	39.3	103.8
	1 / 800	20.4	19.6	104.1
2	1 / 100	65.0	63.0	103.2
	1 / 200	32.0	31.5	101.6
	1 / 400	16.4	15.8	103.8
	1 / 800	8.2	7.9	103.8

10.4 Přesnost

K určení přesnosti této metody byla posouzena variabilita (intra a inter-asay) a to na reprodukovatelnosti výsledků tří vybraných reprezentativních vzorků reprezentujících rozmezí hodnot nad kalibrační křivkou.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)	Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	153.3	3.4	1	144.8	4.2
2	63.7	2.8	2	59.7	2.1
3	24.8	1.4	3	21.4	1.5

10.5 Kalibrace

S ohledem na neexistenci mezinárodních referenčních kalibračních hodnot je tato souprava kalibrována v arbitrárních jednotkách (U/ml).

11. Literatura

1. **Berg PA, Klein R (1989).**
Heterogeneity of antimitochondrial antibodies.
Seminars in liver disease 9: 103-116.
2. **Berg P.A., Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., Kloppel, G. (1982).**
ATPase associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis.
Lancet 2: 1423-1426..
3. **Manns M, Meyer zum Buschenfelde K-H (1989).**
Primare biliare Zirrhose.
In: Hepatologie und Praxis, Meyer zum Buschenfelde K-H, Arnold W, Huttenroth TH eds. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 350-358.
4. **Coppel RL, Gershwin ME (1995).**
Primary biliary cirrhosis: The molecule and the mimic.
Immunological Reviews 44: 17-49..

DODATEK A: Pipetovací protokol

Doporučujeme pipetování průběžných zředěných roztoků referenční plazmy, kontrol a vzorek tímto způsobem:

Pro **kvantitativní vyhodnocení** použijte průběžné zředěné roztoky referenční plazmy k vytvoření kalibrační křivky.

DODATEK B: Postup stanovení