



# ANTI-M2 – PROTILÁTKY (M2)



Kód 44871 96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C
Reagenty pro stanovení protilátek proti M2 (M2). Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.

## ANTI - MITOCHONDRIÁLNÍ PROTILÁTKY (M2)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### PRINCIP METODY

Anti – M2 (mitochondriální M2 podtyp) protilátky ze séra se váží na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zabarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci M2 protilátek ve vzorku<sup>1</sup>.

#### OBSAH A SLOŽENÍ

- A. Koncentrovaný promývací roztok.** 50 mL. Fosfátový pufr, azid sodný 15 mmol/l.
- B. Ředící roztok** 100 mL. Tris, azid sodný 15 mmol/l.
- C+. Pozitivní kontrola.** 1,5 mL. Ready to use. Lidské sérum s anti-M2 protilátkami, azid sodný 15 mmol/L.
- C-. Negativní kontrola.** 1,5 mL. Lidské sérum bez anti-M2 protilátek, azid sodný 15 mmol/L.
- D. Konjugát** 15 mL. Křenovou peroxidázou značené polyklonální králičí imunoglobuliny proti lidskému IgG.
- E. Substrát.** 15 mL. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB).
- F. Zastavovací roztok** . 15 mL. Kyselina fosforečná 4,5%  
**Nebezpečí :** **H314** – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. **P280** – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.  
**P303 + P361 + P353** – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- M. Mikrotitrační destičky:** 12 modulů po 8 rozlamovatelných jamkách s navázanou vysoce purifikovanou mitochondriální látkou, podtypu M2.
- S1-S6. Standardy 1,5mL.** Ready to use. Sérum s anti-M2 protilátkou, azid sodný 15 mmol/L. Koncentrace M2 protilátek jsou: 0, 12,5, 25, 50, 100 a 200 IU/ml, jak je uvedeno na štítku lahviček. Kalibrováno proti WHO referenčnímu standardu 67/183 při 100 IU/ml.

*Pro další varování a doporučení – viz Karta bezpečnostních údajů (SDS).*

*Lidská séra použitá při přípravě pozitivní a negativní kontroly byla testována a shledána negativní na přítomnost protilátek anti-HIV a anti-HCV, a stejně tak na HBs antigen. Nicméně zacházejte s kontrolami jako s potenčně infekčním materiálem.*

#### SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-8°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

#### Známky zhoršení kvality:

- Kapalně komponenty: Přítomnost částic, zákal
- Mikrotitrační destičky: natržení sáčku, makroskopické defekty jako je poškrábání dna jamek.

#### PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

**Promývací pufr:** Zředte koncentrovaný promývací pufr A destilovanou vodou v poměru 1/20. Pořádně promíchejte. Pro 1 strip se spotřebuje přibližně 50 ml promývacího reagentu. Roztok je stabilní 30 dnů při 2-8°C.

Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití - ready to use.

#### PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- zvlhčovací komůrka
- promývací zařízení pro mikrotitrační destičky

M44871i-05

BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain)

Quality System certified according to  
EN ISO 13485 and EN ISO 9001 standards

český překlad 08/2016/VE

07/2015

- reader nebo fotometr s mikrokvetou a filtrem 450±10 nm.

#### VZORKY

Sérum nebo plasma odebraná standardním způsobem. Vzorek před testováním zředte 1/100 ředícím pufrém. K testování vždy použijte čerstvě naředěné vzorky.

#### PRACOVNÍ POSTUP

1. Vytemperujte všechny činidla na pokojovou teplotu ( Pozn.: 1).
2. Otevřete balíček s mikrotitračními destičkami a vyjměte požadované množství pro stanovení ( Poznámka 2).
3. Postup práce:
  - **Kvantitativní stanovení:** Pipetujte po 100 µl každého standardu (S1-S6), Pozitivní kontroly (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek.
  - **Kvalitativní stanovení:** Pipetujte 100 µl S3 Standardu, Pozitivní kontroly (C+), Negativní kontroly (C-) a zředěného vzorku do odlišných jamek. Pipetujte 100 µL ředícího roztoku (B) jako blank.
4. Stripy umístěte do zvlhčovací komůrky a inkubujte je při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
5. Odsajte obsahy jamek a jamky promyjte 3-krát po 300 µl promývacího pufru vždy po dobu nejméně 10 sekund (Poznámka 3 a 4).
6. Pipetujte do všech jamek 100 µl konjugátu (D).
7. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
8. Promyjte jamky podle odstavce č. 5.
9. Pipetujte 100 µl substrátu (E) do všech jamek.
10. Stripy inkubujte ve zvlhčovací komůrce při pokojové teplotě po dobu 15 minut.
11. Pipetujte 100 µl zastavovacího roztoku (F) do všech jamek a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. (Poznámka 5).
12. Odečtete absorbanci jednotlivých jamek při 450 nm za použití S1 standardu nebo jamky blanku pro vynulování přístroje. Zbarvení je stabilní po dobu nejméně 30 minut.

#### VÝPOČET

**Kvantitativní stanovení:** Vyneste do grafu absorbanční hodnoty pro každý standard proti koncentraci anti -M2 v IU/ml. Koncentrace protilátek přítomných ve vzorku se vypočítá interpolací absorbance na kalibrační křivce (doporučená křivka : 4-parametrická logistická, cubic spline, jednostranná hyperbola).

#### Kvalitativní stanovení:

Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off} = A_{450 \text{ nm}} \text{ S3} \times 0,8$$

Vypočtete absorbanční poměr:

$$\text{Absorbanční poměr} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ Vzorku}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ Cut-off}}$$

Jestliže jsou hodnoty absorbancí vyšší než je horní měřicí limit readeru, naředte vzorky reagentem (B) a stanovení opakujte.

#### REFERENČNÍ HODNOTY

Vzorky, s koncentrací větší jak 10 IU/ml, nebo které mají absorbanční poměr vyšší jak 1,0 jsou považovány za pozitivní. Vzorky, s koncentrací nižší jak 10 IU/ml, nebo které mají absorbanční poměr nižší jak 1,0 jsou považovány za negativní. Uvedené hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní rozmezí.



# ANTI-M2 – PROTILÁTKY (M2)



Kód 44871 96 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-8°C
Reagenty pro stanovení protilátek proti M2 (M2). Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.

## ANTI - MITOCHONDRIÁLNÍ PROTILÁTKY (M2)

### ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

#### KONTROLA KVALITY

Absorbance standardu S6 by měla být vyšší než 1,300.  
Koncentrace Pozitivní kontroly (C+) by měla být v rozmezí od 55 do 85 IU/ml a u Negativní kontroly (C-) by měla být nižší jak 10 IU/ml.  
Absorbanční poměr pro negativní kontrolu (C-) by měl být nižší jak 1,0.  
Každá laboratoř by si měla stanovit svojí vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

#### METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

IU/ml	CV %	n
40,1	7,0	24
84,6	3,8	24
180,4	3,6	24

- Reprodukovatelnost (run to run):

IU/ml	CV %	n
40,1	6,2	30
84,6	11,8	30
180,4	3,8	30

- Detekční limit: 1,0 IU/ml
- Stanovení je specifické pro protilátky anti-M2, patřící do skupiny dehydrogenáz 2-oxokyseliny (dřívě  $\alpha$ -ketokyseliny). Nebyly pozorovány žádné zkřížené reakce s ostatními mitochondriálními autoantigeny
- Interference: Hemoglobin do 1000mg/dL, bilirubin do 40mg/dL, triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat<sup>2</sup>.
- Rozsah měření: 1,0–200 IU/ml. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím puřem (B) a opakujte stanovení.

#### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovení antimitochondriálních protilátek AMA má nezastupitelné místo v diagnostice primární biliární cirhózy (PBC). Protilátky jsou přítomné v séru přibližně u 90-95% pacientů. Celkově je známo devět základních typů antimitochondriálních autoprotilátek. Z diagnostického hlediska jsou zatím zdaleka nejvýznamnější tzv. PBC-related (primary biliary cirrhosis-related) protilátky, tedy typy anti-M2, anti-M4, anti-M8 a anti-M9, které se vyskytují zejména u pacientů s primární biliární cirhózou. Tyto protilátky mohou být detekovány roky, dokonce desetiletí před nástupem klinických a histologických symptomů. Z důvodu vysoké senzitivity a specifity se doporučuje pro diferenciální diagnózu PBC používat ELISA test<sup>3,4,5,6</sup>.

Senzitivita byla pro soupravu BioSystems stanovena na 97,2% a specifita na 94,2% ve studii s 470 klinickými vzorky. Detaily klinické studie jsou dostupné na požádání.

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

#### POZNÁMKY

1. Nezaměňujte jednotlivé reagenty z různých souprav.
2. Skladujte nepoužité jamky v plastickém sáčku a uzavřete je společně s vysoušecím sáčkem.
3. Nepoškodte vnitřní povrch mikrotitračních destiček.
4. Promývací roztok by měl být kompletně odstraněn z jamek.
5. Zastavovací roztok (F) enzymové reakce musí být pipetován do jamek přibližně ve stejném časovém odstupu jako substrát (E) v odstavci č.9.

#### LITERATURA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Tanaka A, Miyakawa H, Luketic VA, Kaplan M, Storch WB, Gershwin ME. The diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies, especially in primary biliary cirrhosis. Cell Mol Biol 2002;48(3):295-299.
4. Berg PA, Klein R. Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies. Sem Liver Dis 1989; 9:103-116.
5. Baum H, Palmer C. The PBC specific antigen. Mol Aspects Med 1985; 8:201-234.
6. Fussey SPM, Guest JR, James OFW, Bassendine MF, Yeanman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8654-8658.7

#### UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 25.8.2016.  
Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme přezkontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: [www.biosystems-sa.com](http://www.biosystems-sa.com).  
Český návod je k dispozici na: [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)

#### Výhradní distributor:

**ČR** : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5,  
tel.: +420 257 220 760  
**SK** : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava,  
tel.: + 421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

**ČR** : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK,  
tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02  
**SK** : Toxikologické informační centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166