

DIASTAT[®]

Anti-Mitochondria

For professional use only
Usage reserve aux professionnels
Sólo para uso profesional
Nur für den fachgebrauch
Solo per uso professionale
Endast för professionell användning



Document No. E-23-0117-06
January, 2014

DIASTAT[®] Anti-Mitochondria

English: page 2
Français: page 11
Español: página 21
Deutsch: Seite 31
Italiano: pagina 40
Svenska: sida 49

REF

FMIT 200

IVD



ENGLISH : INTENDED USE

The DIASTAT[®] Anti-mitochondrial antibody test is a qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG and IgM autoantibodies specific for the M2 antigen of the mitochondrial membrane in human serum or plasma. Detection of these autoantibodies is a useful aid in the diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis and is not definitive in isolation. Autoantibody levels represent one parameter in a multicriterion diagnostic process.

INTRODUCTION





Primary Biliary Cirrhosis (PBC) is a chronic and often fatal cholestatic autoimmune liver disease, primarily affecting young to middle-aged women^{1,2}. It is characterised by slow, progressive destruction of intrahepatic bile ducts, portal inflammation and scarring, eventually leading to cirrhosis and liver failure. Clinical manifestations, biochemical tests and the detection of circulating anti-mitochondrial antibodies (AMAs) are used for diagnosis of PBC. Histological examination provides confirmatory information and is helpful in assessing prognosis. AMAs are reportedly present in over 95% of biopsy-proven PBCs^{3,4}, they have been observed at low levels in patients with other diseases^{4,5} and in apparently healthy individuals^{6,7}. Disease-specific subtypes of AMAs have been identified and are regarded as specific and sensitive markers for PBC. To date, several autoantigens have been identified⁸; of these, the M2 antigen is believed to be specific for PBC^{4,9,10}. It is composed of two immunoreactive polypeptides of approximately 70kD and 50kD and has been identified as part of the pyruvate dehydrogenase complex, a major mitochondrial enzyme^{4,10}.

Current techniques available for the detection of AMAs include immunofluorescence, radio-immunoassay, enzyme-immunoassay and immunoblotting. The most commonly used method is immunofluorescence on the HEp 2 substrate, however immunofluorescent staining patterns can be non-specific, making identification of the antigen subtype difficult. ELISAs offer increased sensitivity, simplicity and more rapid results.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with M2 antigen. During the first incubation, specific autoantibodies in diluted serum or plasma bind to the antigen-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, enzyme-labelled antibodies to human IgG and IgM, binds any surface-bound autoantibodies. After further washing, specific autoantibodies are traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units and compared with that bound by the Reference Control.

KIT COMPONENTS

A	IgG/IgM Conjugate	1 x 15mL	Alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG and IgM, Tris buffer, protein stabiliser, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
B	Substrate	1 x 15mL	Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage.	
C	Stop Solution	1 x 15mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). Ready-to-use.	
D	Wash Buffer Concentrate (16X)	2 x 25mL	Borate buffer, 0.4% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
E	M2-Coated Wells and Strip Holder	12 x 8 well microtitre strips	Coated with M2 antigen, in a resealable foil pack with desiccant. Colour-coded PINK . Individual wells can be broken off from each microtitre strip.	
F	Sample Diluent Concentrate (5X)	1 x 25mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
6	Anti-M2 Reference Control	1 x 1.5mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
+/-	Positive Control Negative Control	1 x 0.2mL 1 x 0.1mL	Human plasma, <0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:101 with diluted Sample Diluent before use, as for samples.	
	Pack Leaflet			

STORAGE OF REAGENTS

Opened Kit Stability

A kit was opened and reused on three occasions over a three month period with no adverse effect on kit performance.

Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2-8° C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. Do not freeze kits.
4. Wash Buffer Concentrate, Sample Diluent Concentrate and Positive and Negative Controls must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
5. Diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent are stable at 2-8° C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
6. Replace surplus microtitre strips in the foil pack and store with the desiccant at 2-8° C, until required.
7. The plate holder is adapted for use with snappable wells only.
8. Do not expose Substrate to light during storage.
9. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.

Indications of Deterioration

The Substrate should be pale yellow in colour. Pink colouring indicates contamination and the reagent must be discarded. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded.

Sample Collection and Storage

The assay is recommended for serum/plasma samples; do not use lipaemic, haemolysed or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Do not heat-inactivate samples, this may yield false positive results.

Samples may be stored at or below -20° C, or assayed within 12 hours of collection.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only.

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. The Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edition, 1993, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Controls, Conjugate, Sample Diluent Concentrate and Wash Buffer Concentrate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.
7. The Stop Solution contains sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped up with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.
8. The substrate contains PMP, Bronidox L and Diethanolamine. Avoid contact with skin, eyes and respiratory system. If contact with skin, eyes or respiratory system occurs, rinse with water and seek medical advice.
9. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.



Warning

B.

SUBS

Contains: Diethanolamine

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Causes serious eye irritation. |
| P264: | Wash hands thoroughly after handling. |
| P280: | Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. |
| P305+P351+P338: | IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. |
| P337+P313: | If eye irritation persists: Get medical advice/attention. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Warning

Contains: Sodium hydroxide

- H315: Causes skin irritation.
 H319: Causes serious eye irritation.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
 P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
 P332+P313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
 P337+P313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Warning

Contains: Sodium azide

- H302: Harmful if swallowed.
 EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.
 H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
 P273: Avoid release to the environment.

P R E P A R A T I O N

Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 550nm filter (540-565nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10µL, 100µL, 1mL. Automatic pipette to dispense 100µL. Automatic pipette to dispense 200µL for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1x100mL, 1x400mL.
4. 1mL volume containers.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. Timer for 30 and 60 minute intervals.

Preparation for the Assay

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18-25° C for 30-60 minutes before use. Mix reagents by gentle inversion.

Do not dilute the Reference Control.

Dilute the following reagents and mix thoroughly.

Reagent	Volume	Add
Wash Buffer Concentrate	1 vial	375mL distilled/deionised water
Sample Diluent Concentrate	1 vial	100mL distilled/deionised water
Positive and Negative Controls/samples	10µL	1mL diluted Sample Diluent

Microtitre wells are supplied in strips of eight. If other than a multiple of eight wells are required, proceed as follows.

1. Remove strip from holder by pushing underside of wells.
2. Snap off required number of wells.
3. Hinge rectangular hole into bottom edge (to H) of the holder groove.
4. Ensure the square hole, with nick on left, is firmly held along the top edge (row A).

ASSAY PROTOCOL

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100µL Reference Control in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls, and pre-diluted patient samples into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed 15 minutes for any one set of Controls/samples.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Decant strip contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted strips well with paper towels.
5. Wash wells **three times** with a minimum of 200µL diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100µL IgG/IgM Conjugate to each well.
7. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100µL Substrate to each well.
10. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C. **Do not decant.**
11. Add 100µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
12. Read strips within 24 hours at 550nm (540-565nm).

CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

Consider each assay separately when calculating and interpreting results.

Calculate the absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample.

$$\text{Absorbance Ratio} = \frac{\text{Sample or Control Absorbance Value}}{\text{mean Reference Control Absorbance Value}}$$

Users should calculate a cut-off between positive and negative samples that is specific to their patient populations. Results from the patient populations used in the Euro Diagnostica clinical trial suggest the following cut-off:

Absorbance Ratio
<0.95
≥0.95 to ≤1.0
>1.0

Result Interpretation
Negative
Borderline - recommend repeat testing
Positive

QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes. Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. It is recommended that the pre-diluted Positive and Negative Controls are run in duplicate in all assays to monitor the quality of the test procedure. Run the ready-to-use Reference Control in duplicate in all assays.

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of any Control to meet the Control ratio specifications below renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and sample. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below -20° C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Preservatives such as sodium azide at 0.1% (w/v) will not affect sample results.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature. Incidence levels, their relationship to specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

Control Ratio Specifications	
Positive Control Absorbance Reference Control Absorbance	see Positive Control label
Negative Control Absorbance Reference Control Absorbance	<1.0

EXPECTED VALUES

Serum samples were collected from reference centres and from asymptomatic healthy individuals. Using the sample to Reference Control ratio of <1 as a cut-off, greater than 99% of the asymptomatic population were negative for anti-mitochondrial IgG and IgM antibodies. The distribution of results found in specific disease groups is given in the following table.

Control and Disease Groups	n	% Positive using Sample to Reference Control ratio > 1
Asymptomatic Healthy	193	0.5
Primary Biliary Cirrhosis	72	95.8
Anti-Centromere Antibody Positive	17	11.8
Systemic Lupus Erythematosus	62	3.2
Chronic Active Hepatitis	5	-
Scleroderma	18	-
Sjögren's Syndrome	21	-
Viral Infections	23	-
Rheumatoid Arthritis	19	-
Polymyositis	23	-

LIMITATIONS OF USE

1. Although the presence of high titres of antibodies to M2 antigen is indicative of Primary Biliary Cirrhosis, the data must be considered in light of other clinical and laboratory findings.
2. Some individuals may have high levels of anti-M2 antibodies with little or no evidence of clinical disease. By contrast, a small number of patients with PBC may have undetectable levels of these antibodies.
3. For repeat patient sampling, e.g. for monitoring, the same type of sample (serum or plasma) should be used throughout the study period.

REFERENCES

1. Kaplan MM. *New England Journal of Medicine*, **316**, 9, 521-529, 1987.
2. Powell FC, Schroeter AL, Dickson ER. *Quarterly Journal of Medicine*, New Series 62, **237**, 75-82, 1987.
3. Kyriatsoulis A, Manns M, et al. *J Immun Methods*, **109**, 113-121, 1988.
4. McHugh NJ, James IE, et al. *Clin Exp Immunol*, **81**, 244-249, 1990.
5. Neuberger J, Lombard M, Galbraith R, *Gut Supplement*, S73-S78, 1991.
6. Berg PA, Homberg JC, et al. *Lancet*, October 10, 1981.
7. Manns M. *Journal of Hepatology Review*, **9**, 272-280, 1989.
8. Surh CD, Danner DJ, et al. *Hepatology*, **9**, 1, 63-68, 1989.
9. Gupta RC. *Clin Exp Immunol*, **59**, 604-612, 1985.
10. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. *Hepatology*, **5**, 5, 763-769, 1985.

SUMMARY OF PROTOCOL

1. Dilute samples and Positive and Negative Controls 1:101. Do not dilute Reference Control.
2. Add 100µL of Reference Control in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls and samples into referenced wells of the microtitre strip.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Wash strips 3 times.
5. Add 100µL of IgG/IgM Conjugate to each well.
6. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
7. Wash strips 3 times.
8. Add 100µL of Substrate to each well.
9. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
10. Add 100µL of Stop Solution to each well.
11. Read absorbance at 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	M2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de M2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2 / M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di M2 e supporto per strip /M2-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-M2 Standards 1-5/ Etalons anti-M2 1-5 / Estandares Anti-M2 1-5 / Anti-M2 Standards 1-5 / Standard anti-M2 1-5 / Anti-M2-standarder
CONTROL REF	Anti-2 Reference Control/ Témoins de référence anti-M2 / Control de Referencia Anti-M2 / Anti-M2 Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-M2 / Anti-M2 referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

FRANÇAIS : USAGE PREVU

Le test pour anticorps anti-mitochondries DIASTAT[®] est un immunodosage enzymatique qualitatif (méthode ELISA) pour la détection des auto-anticorps des classes IgG et IgM spécifiques de l'antigène M2 associé à la membrane des mitochondries dans le sérum ou plasma humain. La détection de ces auto-anticorps est une aide utile pour poser le diagnostic de Cirrhose biliaire primitive, bien que son résultat à lui seul ne permette pas de poser un tel diagnostic. Les taux d'auto-anticorps représentent un paramètre dans un procédé diagnostique à plusieurs critères.

I N T R O D U C T I O N

La cirrhose biliaire primitive (CBP) est une maladie hépatique auto-immune cholestatique chronique et souvent fatale, qui affecte principalement les femmes jeunes et d'un âge moyen^{1,2}. Elle se caractérise par une destruction progressive et lente des canaux biliaires intra-hépatiques, et par une inflammation et des cicatrices interlobulaires, qui conduisent en fin de compte à la cirrhose et à une insuffisance hépatique.





Le diagnostic de CBP est prononcé en fonction des manifestations cliniques, des tests biochimiques et de la détection d'anticorps anti-mitochondries (AAM) circulants. L'examen cytologique apporte les informations confirmant le diagnostic, et il est utile pour déterminer le pronostic. La présence d'AAM a été rapportée dans plus de 95 % des cas de CBP confirmée par biopsie^{3,4} ; ces AAM ont été observés à faibles taux chez des patients avec d'autres affections^{4,5} et chez des individus apparemment en bonne santé^{6,7}. Les sous-types d'AAM spécifiques de maladie ont été identifiés, et ils sont considérés comme des marqueurs spécifiques et sensibles pour la CBP. Jusqu'à ce jour, plusieurs anti-antigènes ont été identifiés⁸; parmi lesquels l'antigène M2 qui, on le pense, est spécifique de la CBP^{4,9,10}. Il se compose de deux polypeptides immunoréactifs d'approximativement 70kD et 50kD et il a été identifié comme faisant partie du complexe pyruvate-déshydrogénase, une importante enzyme mitochondriale^{4,10}.

Les techniques disponibles actuellement pour détecter les AAM incluent l'immunofluorescence, le radio-immuno-dosage, l'immunodosage enzymatique et l'immunoblot. La méthode utilisée le plus souvent est l'immunofluorescence sur le substrat HEP2 ; toutefois, l'aspect de la coloration immunofluorescente peut être non spécifique, ce qui rend l'identification du sous-type d'antigène difficile. Les dosages ELISA sont plus sensibles et plus simples, et ils donnent des résultats plus rapidement.

P R I N C I P E D U D O S A G E

Les cupules de bandes de microtitrage sont enduites d'antigène M2. Durant la première incubation, les auto-anticorps qui se trouvent dans le sérum ou le plasma dilué se fixent à la surface enduite d'antigène. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les constituants non fixés. Durant la seconde incubation, le Conjugué, les anticorps marqués avec une enzyme et dirigés contre IgG et IgM humaines, se fixent à des auto-anticorps fixés à la surface quelconques. Après un autre lavage, les auto-anticorps spécifiques sont dépistés par incubation avec le Substrat. L'addition de la Solution d'arrêt met fin à la réaction, et on obtient alors un produit final coloré. La quantité de Conjugué qui s'est fixée est mesurée en unités d'absorption et comparée à celle qui a été fixée par le Témoin de référence.

CONSTITUANTS DU NECESSAIRE

A	Conjugué IgG/IgM	1 x 15mL	Anticorps marqués à la phosphatase alcaline, et dirigés contre l'IgG humaine et IgM, Tampon Tris, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
B	Substrat	1 x 15mL	Mg ²⁺ , monophosphate de phénolphtaléine (MPP), solution tampon. Prêt à l'emploi. Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation.	
C	Solution d'Arrêt	1 x 15mL	Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH >10). Prêt à l'emploi.	
D	Concentré tampon de lavage (16X)	2 x 25mL	Tampon borate, azoture de sodium à 0,4 % (p/v). Diluer avant l'usage.	
E	Cupules enduites de M2 et Porte-bandes	12 bandes de microtitrage à 8 cupules	Enduites d'antigène M2, dans une poche en aluminium refermable contenant un desséchant. Codées ROSE . Des cupules individuelles peuvent être détachées de chaque bande de microtitrage.	
F	Concentré diluant pour échantillons (5X)	1 x 25mL	Tampon phosphate, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à 0,5 % (p/v). Diluer avant l'usage.	
6	Témoins de référence anti-M2	1 x 1.5mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
+/-	Témoin positif Témoin négatif	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Plasma humain, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Diluer à 1:101 avec le diluant pour échantillons dilué avant l'usage, comme pour les échantillons.	
	Notice incluse dans le conditionnement			

CONSERVATION DES REACTIFS

Stabilité des nécessaires déjà ouverts

Un nécessaire a été ouvert et réutilisé à trois occasions sur une période de trois mois, et cela n'a pas affecté sa performance.

Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2-8° C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les nécessaires.
4. Diluer le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant pour échantillons et les Témoins négatifs et positifs avant l'usage. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le tampon de lavage dilué et le Diluant dilué pour échantillons restent stables pendant un maximum de 6 mois à 2-8° C si toute contamination microbienne est évitée.
6. Remettre les bandes de microtitrage non utilisées dans la poche d'aluminium contenant du desséchant, et conserver à 2-8° C, jusqu'à ce que l'on en est besoin.
7. Le porte-plaques a été adapté pour n'être utilisé qu'avec des cupules détachables par cassure nette.
8. Ne pas exposer le Substrat à la lumière durant la conservation.
9. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.

Indications d'une détérioration

Le Substrat doit être d'une couleur jaune pâle. Une couleur rose indique qu'il y a eu contamination et le réactif doit alors être jeté. Un trouble ou une précipitation dans n'importe quel constituant indique qu'il y a eu détérioration et le constituant doit être jeté.

Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage est recommandée pour des échantillons de sérum/plasma; ne pas utiliser des échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons peuvent être conservés à $\leq -20^{\circ}\text{C}$, ou bien analysés dans les 12 heures suivant leur prélèvement.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Réservé à l'usage diagnostique *in vitro*.

Précautions de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. Les Témoins contiennent du plasma humain testé avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, du virus HCV, de l'antigène associé au VIH et d'anticorps anti-VIH, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Etant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance potentiellement biologiquement dangereuse. Le Manuel de Santé du Centre épidémiologique/des Instituts nationaux de la santé (CDC/NIH), intitulé "Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux", 3ème édition, 1993, décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux Etats-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toute éruption cutané, coupure, abrasion et autre lésion cutanée de manière adéquate.
6. Les Témoins, Conjugué, Concentré diluant pour échantillons et Concentré tampon de lavage contiennent tous de l'azoture de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.
7. La Solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Eviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Disperser tout déversement avec de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, irriguer avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. Le substrat contient du PMP, du Bronidox L et de la diéthanolamine. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires. En cas de contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires, laver avec de l'eau et consulter un médecin.
9. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès de Euro Diagnostica.



Attention

B.

SUBS

Contient: Diéthanolamine

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Provoque une sévère irritation des yeux. |
| P264: | Se laver soigneusement les mains après manipulation. |
| P280: | Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. |
| P305+P351+P338: | EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs. |
| P337+P313: | Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Attention

Contient: Hydroxyde de sodium

- H315: Provoque une irritation cutanée.
 H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs.
 P332+P313: En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attention

Contient: Azoture de sodium

- H302: Nocif en cas d'ingestion.
 EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
 H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P301+P312: EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
 P273: Éviter le rejet dans l'environnement.

P R E P A R A T I O N

Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire

1. Lecteur de plaque/bande à 96 cupules, avec filtre de 550nm (540-565nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10µL, 100µL, 1mL. Pipette automatique pour distribuer 100µL. Pipette automatique pour distribuer 200µL pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Epruvettes graduées en verre/matière plastique : 1×100mL, 1×400mL.
4. Récipients contenant 1mL.
5. Eau distillée/désionisée .
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation pour le dosage

Attendre 30 à 60 minutes pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18-25° C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

Ne pas diluer le Témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

Réactif	Volume	Ajouter
Concentré tampon de lavage	1 flacon	375mL d'eau distillée/désionisée
Concentré diluant pour échantillons	1 flacon	100mL d'eau distillée/désionisée
Témoins positifs et négatifs/échantillons	10 µL	1mL de Diluant dilué pour échantillons

Les cupules de microtitrage sont fournies en bandes de huit. Si on a besoin d'un nombre de cupules qui n'est pas un multiple de huit, procéder de la manière suivante .

- Sortir la bande du porte-bandes en poussant sous les cupules.
- Séparer le nombre requis de cupules de la bande en cassant net.
- Glisser le trou rectangulaire dans la bordure du bas (en H) de la rainure du porte-bandes.
- S'assurer que le trou carré, avec l'encoche à gauche, est fermement maintenu le long de la bordure supérieure (rangée A).

PROTOCOLE DU DOSAGE

- Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
- Avec une pipette, prélever 100µL du Témoin de référence, en double exemplaire, des témoins positifs et négatifs et des échantillons du patient prédilués, puis déposer dans les cupules appropriées. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette pour chaque addition. Cette étape ne doit pas prendre plus de 15 minutes pour n'importe quel groupe de Témoins/échantillons.
- Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25° C.
- Décanté le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
- Laver les cupules **trois fois** avec un minimum de 200µL de Tampon de lavage. **Décanté et éponger après chaque étape du lavage.**
- Ajouter 100µL de Conjugué IgG/IgM dans chaque cupule.
- Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
- Répéter les étapes 4 et 5.
- Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
- Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C. **Ne pas décanter.**
- Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
- Lire les résultats indiqués sur les bandes après 24 heures à 550nm (540-565nm).

CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RESULTATS

Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.
Calculer le coefficient d'absorption (densité optique) pour les Témoins positifs et négatifs, et pour chaque échantillon.

$$\text{Coefficient d'absorption} = \frac{\text{Valeur d'absorption de l'échantillon ou du Témoin}}{\text{Valeur d'absorption moyenne du Témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer une valeur seuil entre les échantillons positifs et négatifs qui est spécifique de leurs populations de patients. Les résultats obtenus des populations de patients utilisées dans l'essai clinique Euro Diagnostica suggèrent la valeur seuil suivante :

<u>Coefficient d'absorption</u>	<u>Interprétation des résultats</u>
<0,95	Négatif
≥0,95 à ≤1,0	Valeur limite - il est recommandé de refaire le test
>1,0	Positif

CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte. Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Sections sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre. Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Il est recommandé que les témoins positifs et négatifs prédilués soient analysés en double exemplaire dans tous les dosages afin de contrôler la qualité de la méthode de test. Analyser le Témoin de référence prêt à l'emploi en deux exemplaires dans tous les dosages.

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications du coefficient des Témoins indiquées ci-dessous, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température -20°C, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Les agents de conservation tels que l'azoture de sodium n'affecteront pas les résultats obtenus avec les échantillons.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne reflèteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

Spécifications des coefficients des Témoins

Absorption du Témoin positif	voir étiquette du Témoin positif
Absorption du Témoin de référence	
Absorption du Témoin négatif	<1,0
Absorption du Témoin de référence	

VALEURS ATTENDUES

Des échantillons sériques ont été prélevés dans des centres de référence et chez des individus en bonne santé et asymptomatiques. En utilisant un rapport Echantillon:Témoin de référence < 1 comme valeur seuil, plus de 99 % des individus asymptomatiques ont obtenu un résultat négatif pour les anticorps anti-mitochondries des classes IgG et IgM. La répartition des résultats obtenue dans des groupes spécifiques de patients est donnée dans le tableau suivant.

Groupes de témoins et de patients	n	% de résultats positifs en utilisant un rapport Echantillon:Témoin de référence > 1
En bonne santé et asymptomatiques	193	0,5
Cirrhose biliaire primitive	72	95,8
Positifs pour anticorps anti-centromère	17	11,8
Lupus érythémateux aigu disséminé	62	3,2
Hépatite évolutive chronique	5	-
Sclérodermie	18	-
Syndrome de Sjögren	21	-
Infections virales	23	-
Polyarthrite rhumatoïde	19	-
Polymyosite	23	-

RESTRICTIONS D'UTILISATION

1. Bien que la présence de taux élevés d'anticorps dirigés contre l'antigène M2 indique la présence de Cirrhose biliaire primitive, les données doivent être considérées en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques.
2. Chez certains individus, il peut y avoir des taux élevés d'anticorps anti-M2 mais peu ou pas de preuves d'une affection clinique. Par contre, il se peut que des patients avec une CBP aient des taux indétectables de ces anticorps.
3. Pour des échantillonnages répétitifs chez un patient, par ex. à des fins de monitoring, le même type d'échantillon (sérum ou plasma) doit être utilisé durant toute la période d'étude

REFERENCES

1. Kaplan MM. *New England Journal of Medicine*, **316**, 9, 521-529, 1987.
2. Powell FC, Schroeter AL, Dickson ER. *Quarterly Journal of Medicine*, New Series 62, **237**, 75-82, 1987.
3. Kyriatsoulis A, Manns M, et al. *J Immun Methods*, **109**, 113-121, 1988.
4. McHugh NJ, James IE, et al. *Clin Exp Immunol*, **81**, 244-249, 1990.
5. Neuberger J, Lombard M, Galbraith R. *Gut Supplement*, S73-S78, 1991.
6. Berg PA, Homberg JC, et al. *Lancet*, October 10, 1981.
7. Manns M. *Journal of Hepatology Review*, **9**, 272-280, 1989.
8. Surh CD, Danner DJ, et al. *Hepatology*, **9**, 1, 63-68, 1989.
9. Gupta RC. *Clin Exp Immunol*, **59**, 604-612, 1985.
10. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. *Hepatology*, **5**, 5, 763-769, 1985.

RESUME DU PROTOCOLE

1. Diluer les échantillons et les Témoins positifs et négatifs à raison de 1: 101. Ne pas diluer le Témoin de référence.
2. Ajouter 100µL de Témoin de référence en double exemplaire, de Témoins positifs et négatifs et d'échantillons prédilués dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25° C.
4. Laver les bandes 3 fois.
5. Ajouter 100µL de Conjugué IgG/IgM dans chaque cupule.
6. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
7. Laver les bandes 3 fois.
8. Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
9. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
10. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule.
11. Lire la capacité d'absorption à 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	M2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de M2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2 / M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di M2 e supporto per strip /M2-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-M2 Standards 1-5/ Etalons anti-M2 1-5 / Estandares Anti-M2 1-5 / Anti-M2 Standards 1-5 / Standard anti-M2 1-5 / Anti-M2-standarder
CONTROL REF	Anti-2 Reference Control/ Témoins de référence anti-M2 / Control de Referencia Anti-M2 / Anti-M2 Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-M2 / Anti-M2 referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

ESPAÑOL: USO PREVISTO

La prueba de anticuerpo anti-mitocondria DIASTAT® es un análisis inmunosorbente con anticuerpo ligado enzima (ELISA) cualitativo, para la detección de autoanticuerpos IgG e IgM específicos para el antígeno M2 de la membrana mitocondrial en plasma o suero humano. La detección de estos autoanticuerpos resulta útil para el diagnóstico de la Cirrosis Biliar Primaria, y no es definitiva por sí sola. Los niveles de autoanticuerpos representan un parámetro de un proceso diagnóstico de múltiples criterios.

INTRODUCCIÓN

La Cirrosis Biliar Primaria (CBP) es una enfermedad hepática autoinmune colestática, crónica y, con frecuencia fatal, que afecta básicamente a mujeres jóvenes y de mediana edad^{1,2}. Está caracterizada por destrucción lenta y progresiva de los conductos biliares intrahepáticos, inflamación portal y cicatrización, que provoca finalmente una cirrosis y un fallo hepático.





Las manifestaciones clínicas, las pruebas bioquímicas y la detección de anticuerpos anti-mitocondriales circulantes (AMAs) se utilizan para el diagnóstico de la CBP. El examen histológico proporciona datos de confirmación y resulta útil para valorar el pronóstico. Se ha señalado que los AMAs están presentes en más del 95% de las CBP demostradas en la biopsia^{3,4}, y que han sido observados en niveles bajos en pacientes con otras enfermedades^{4,5} y en individuos aparentemente sanos^{6,7}. Se han identificado subtipos de AMAs específicos a la enfermedad, que son considerados como marcadores específicos y sensibles para la CBP. Hasta la fecha, se han identificado varios autoantígenos⁸; de éstos, se cree que el antígeno M2 es específico para la CBP^{4,9,10}. Está compuesto por dos polipéptidos inmunorreactivos de, aproximadamente, 70kD y 50kD, y se ha identificado como parte del complejo piruvicodeshidrogenasa, una enzima mitocondrial^{4,10}.

Entre las técnicas actuales disponibles para la detección de AMAs se incluyen la inmunofluorescencia, el radio-inmunoanálisis, el inmunoanálisis enzimático y la inmunoelectroforesis. El método utilizado con más frecuencia es la inmunofluorescencia en el sustrato HEp 2; sin embargo, los modelos de coloración inmunofluorescente pueden no ser no específicos, lo que dificulta la identificación del subtipo del antígeno. Los ELISAs ofrecen una mayor sensibilidad, simplicidad y resultados más rápidos.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los vasos de las bandas de microtitulación se recubren con antígeno M2. Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos en plasma o suero diluido se fijan a la superficie recubierta con el antígeno. A continuación, se lavan los vasos para eliminar los componentes no fijados. En la segunda incubación, el Conjugado, anticuerpos marcados con enzima a IgG e IgM humanas, se fijan a cualquier autoanticuerpo fijado a la superficie. Después de otro lavado, se determinan los autoanticuerpos específicos mediante la incubación con el Sustrato. El añadido de la Solución de Parada finaliza la reacción, produciendo un producto final coloreado. La cantidad de Conjugado fijado se mide en unidades de absorbencia y se compara con la fijada por el Control de Referencia.

COMPONENTES DEL KIT

A	Conjugado IgG/IgM	1 x 15mL	Anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina a IgG and IgM humana, búfer Tris, estabilizador de proteínas, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
B	Substrato	1 x 15mL	Mg ²⁺ , monofosfato de fenoltaleína (PMP), solución de búfer. Listo para su uso. No exponer a la luz durante el almacenamiento.	
C	Solución de Parada	1 x 15mL	Hidróxido de sodio, EDTA, búfer carbonatado (pH >10). Listo para su uso.	
D	Concentrado de Búfer de Lavado (16X)	2 x 25mL	Búfer boratado, 0,4% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
E	Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2	12 x 8 bandas de microtitulación de vasos	Recubiertos con antígeno M2, en un paquete metalizado y resellable con desecante. Código de colores ROSA . Los vasos individuales pueden separarse de cada banda de microtitulación.	
F	Concentrado de Diluyente de Muestra (5X)	1 x 25mL	Búfer fosfatado, estabilizador de proteínas, 0,5% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
6	Control de Referencia Anti-M2	1 x 1,5mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
+/-	Control Positivo Control Negativo	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Plasma humano, <0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1:101 con Diluyente de Muestra diluido antes de su uso, por lo que respecta a las muestras.	
	Folleto del Paquete			

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Estabilidad del Kit Una Vez Abierto

Un kit fue abierto y reutilizado en tres ocasiones durante un período de tres meses sin efectos adversos sobre la eficacia del mismo.

Notas sobre la Manipulación y los Procedimientos

1. Guardar los componentes del kit a 2-8° C y utilizar hasta la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas. No utilizar reactivos caducados.
2. No mezclar números de lote diferentes.
3. No congelar los kits.
4. El Concentrado de Búfer de Lavado, el Concentrado de Diluyente de Muestra y los Controles Positivos y Negativos deben diluirse antes de su utilización. Todo el resto de reactivos están listos para ser usados.
5. El Búfer de Lavado diluido y el Diluyente de Muestra diluido son estables a 2-8° C durante 6 meses si se evita la contaminación microbiana.
6. Volver a colocar las bandas de microtitulación sobrantes en el paquete metálico y guardar con el producto desecante a 2-8° C hasta su reutilización.
7. El soporte para placas está adaptado para ser utilizado únicamente con vasos encajables.
8. No exponer el Substrato a la luz durante el almacenamiento.
9. Evitar la contaminación de reactivos. Utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada manipulación de muestra o reactivo.

Signos de Deterioro

El Substrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo. La turbiedad o precipitación en cualquier componente indica deterioro y hay que desechar el componente.

Recogida y Almacenamiento de Muestras

El análisis está recomendado para muestras de suero/plasma; no utilizar muestras turbias, hemolizadas ni lipémicas. Mezclar minuciosamente las muestras descongeladas antes del análisis y no volver a congelar/descongelar. No calentar las muestras inactivadas, ya que esto podría producir resultados falsos positivos.

Las muestras pueden guardarse a temperaturas de -20° C o inferiores, o analizarse en un plazo de 12 horas desde su obtención.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Precauciones de Seguridad

1. Siga estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente las relativas a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Los Controles contienen plasma humano al que se han realizado pruebas con análisis aprobados por la FDA para antígeno de superficie de la hepatitis B, VHC, antígeno VIH y anticuerpos VIH y cuyos resultados han sido no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece una garantía total de que no estén presentes agentes infecciosos, hay que considerar los Controles como potencialmente infecciosos y manipularlos con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. El Manual de Salud CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ª edición, 1993, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
3. No pipetar con la boca.
4. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
5. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes y abrasiones de la piel así como otras lesiones dermatológicas.
6. Los Controles, el Conjugado, el Concentrado de Diluyente de Muestra y el Concentrado de Búfer de Lavado contienen azida sódica que puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas extremadamente explosivas. Para su eliminación, verter con grandes cantidades de agua para impedir la formación de azida.
7. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si se produce contacto con piel u ojos, lavar con agua y acudir inmediatamente a un médico.
8. El sustrato contiene PMP, Bronidox L, y Dietanolamina. Evite el contacto con la piel, los ojos y mucosas. Si se produce contacto con la piel, los ojos o mucosas, aclárelos con agua y consulte con su médico.
9. Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.



B.

SUBS

Atención

Contiene: Dietanolamina

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Provoca irritación ocular grave. |
| P264: | Lávese bien las manos después de manipular. |
| P280: | Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. |
| P305+P351+P338: | EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. |
| P337+P313: | Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. |



Atención

C.

SOLN	STOP
------	------

Contiene: Hidróxido de sodio

- H315: Provoca irritación cutánea.
 H319: Provoca irritación ocular grave.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
 P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
 P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



Atención

D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Contiene: Azida sódica

- H302: Nocivo en caso de ingestión.
 EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
 H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a.
 P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

PREPARACIÓN

Materiales/Equipos Necesarios No Suministrados

1. Lector de banda/placa de vasos 96 con filtro 550 nm (es aceptable 540-565 nm).
2. Pipetas de precisión para dispensar 10 µL, 100 µL, 1mL. Pipeta automática para dispensar 100 µL. Pipeta automática para dispensar 200 µL para el lavado manual; lavador automático de placa opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1x100 mL, 1x400 mL.
4. Recipientes con volumen 1mL.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallitas de papel.
7. Cronómetro para intervalos de 30 y 60 minutos.

Preparativos para el Análisis

Dejar que todos los componentes del kit, incluidas las bandas de microtitulación, se templen a 18-25° C durante 30-60 minutos antes de su utilización. Mezclar los reactivos mediante una suave inversión.

No diluir el Control de Referencia.

Diluir los siguientes reactivos y mezclar minuciosamente.

Reactivo	Volumen	Añadir
Concentrado de Búfer de Lavado	1 vial	375 mL de agua destilada/desionizada
Concentrado de Diluyente de Muestra	1 vial	100 mL de agua destilada/desionizada
Muestras/Controles Positivos y Negativos	10 µL	1mL de Diluyente de Muestra diluido

Los vasos de microtitulación se suministran en bandas de ocho unidades. Si es necesario un número de vasos no múltiplo de ocho, proceda del siguiente modo.

1. Extraiga la banda del soporte presionando el fondo de los vasos.
2. Desencaje el número necesario de vasos.
3. Encaje el orificio rectangular en el borde inferior (a H) de la ranura del soporte.
4. Compruebe que el orificio cuadrado, con la muesca a la izquierda, está firmemente sujeto en todo el borde superior (fila A).

PROTOCOLO DEL ANÁLISIS

1. Vasos de referencia para identificación.
2. Pipetar 100µ de Control de Referencia por duplicado, Controles Negativos y Positivos prediluidos, y muestras de pacientes prediluidas, en los vasos apropiados. No olvide cambiar las puntas de las pipetas entre añadidos. Esta fase no debe durar más de 15 minutos para ningún conjunto de Controles/muestras.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Decantar el contenido de la banda mediante inversión rápida sobre un lavabo adecuado para la eliminación de materiales biológicos, teniendo presente el potencial riesgo infeccioso de las muestras. Secar los vasos de las bandas invertidas con toallitas de papel.
5. Lave los vasos **tres veces** con un mínimo de 200µL de Búfer de Lavado diluido. **Decantar y secar después de cada fase de lavado.**
6. Añadir 100µ IgG/IgM de Conjugado a cada vaso.
7. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
8. Repetir los pasos 4 y 5.
9. Añadir 100 µL de Substrato a cada vaso.
10. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C. **No decantar.**
11. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada vaso, en el mismo orden y ritmo que el Substrato. Agitar los vasos con suavidad para mezclar.
12. Leer las bandas a las 24 horas a 550 nm (540-565 nm).

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Considerar cada análisis de forma independiente a la hora de calcular e interpretar los resultados.

Calcular el valor de la tasa de absorbencia (densidad óptica) para los Controles Positivos y Negativos, así como para cada muestra.

$$\text{Tasa de Absorbencia} = \frac{\text{Muestra} \circ \text{Valor de Absorbencia del Control}}{\text{Valor de Absorbencia del Control de Referencia promedio}}$$

Los usuarios deben calcular un límite entre las muestras positivas y negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes utilizadas en la prueba clínica Euro Diagnostica sugieren el siguiente límite:

<u>Tasa de Absorbencia</u>	<u>Interpretación del Resultado</u>
<0,95	Negativo
≥0,95 a ≤1,0	Borderline – se recomienda repetir la prueba
>1,0	Positivo

CONTROL DE CALIDAD

Comprobar que se lleva a cabo un mantenimiento y una calibración de lector de placa apropiados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que se utiliza la longitud de onda correcta.

Los usuarios deben garantizar que están totalmente familiarizados con las instrucciones para la realización del análisis, especialmente la sección de Advertencias y Precauciones y las Notas sobre Manipulación y Procedimientos. Los usuarios deben demostrar que pueden obtener especificaciones de rendimiento precisas y una gama comunicable de resultados de la prueba comparables a los determinados por el fabricante antes de comunicar resultados de pruebas en pacientes. Se recomienda realizar los Controles Negativos y Positivos prediluidos por duplicado en todos los análisis con el fin de monitorizar la calidad del procedimiento de la prueba. Realizar el Control de Referencia listo para su uso por duplicado en todos los análisis Cualitativos.

Suponiendo que se cumplen las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, si alguno de los Controles no cumple las especificaciones de tasa de Control que aparecen a continuación, esto anula el ensayo y no deben proporcionarse los datos de este paciente. El operario puede repetir el análisis, tras haber revisado el procedimiento, o ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Para repetir el análisis, prepare una dilución nueva de cada Control y muestra. Los laboratorios pueden querer incluir controles internos en cada realización del análisis. Guardar dicho material de control a o por debajo de -20° C y evitar repetir los ciclos de congelación/descongelación. Los conservantes tales como la azida sódica a 0,1 % (c/v) no afectarán a los resultados de la muestra

Los niveles analíticos identificados en determinadas enfermedades son los establecidos por el fabricante para poblaciones específicas y no reflejan necesariamente la literatura. Los niveles de incidencia, su relación con enfermedades específicas, los rangos de referencia y los valores límite apropiados deben calcularse para las poblaciones específicas atendidas por los usuarios.

Especificaciones de Tasa de Control

Absorbencia de Control Positivo	Véase etiqueta de Control Positivo
Absorbencia de Control de Referencia	
Absorbencia de Control Negativo	<1,0
Absorbencia de Control de Referencia	

VALORES PREVISTOS

Se obtuvieron muestras de suero de centros de referencia y de individuos sanos asintomáticos. Utilizando la proporción muestra a Control de Referencia <1 como límite, más del 99% de la población asintomática dio un resultado negativo para los anticuerpos antimitocondriales IgG e IgM. En la siguiente tabla aparece la distribución de los resultados hallados en los grupos de enfermedad específicos.

Grupos de Control y de Enfermos	n	% Positivos utilizando la proporción Muestra a Control de Referencia > 1
Sanos Asintomáticos	193	0,5
Cirrosis Biliar Primaria	72	95,8
Anticuerpos Anti-centrómero positivo	17	11,8
Lupus Eritematoso Sistémico	62	3,2
Hepatitis Activa Crónica	5	-
Esclerodermia	18	-
Síndrome de Sjögren	21	-
Infecciones virales	23	-
Artritis Reumatoidea	19	-
Polimiositis	23	-

LIMITACIONES DE USO

1. Aunque la presencia de títulos elevados de anticuerpos al antígeno M2 es indicativa de Cirrosis Biliar Primaria, hay que considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Algunas personas pueden presentar niveles elevados de anticuerpos anti-M2 con escasas o ninguna evidencia de enfermedad clínica. Por el contrario, un pequeño número de pacientes con CBP puede presentar niveles indetectables de estos anticuerpos.
3. Para una repetición de la toma de muestras del paciente, por ejemplo, para monitorización, se debe utilizar el mismo tipo de muestra (suero o plasma) durante todo el período del estudio.

REFERENCIAS

1. Kaplan MM. *New England Journal of Medicine*, **316**, 9, 521-529, 1987.
2. Powell FC, Schroeter AL, Dickson ER. *Quarterly Journal of Medicine*, New Series 62, **237**, 75-82, 1987.
3. Kyriatsoulis A, Manns M, et al. *J Immun Methods*, **109**, 113-121, 1988.
4. McHugh NJ, James IE, et al. *Clin Exp Immunol*, **81**, 244-249, 1990.
5. Neuberger J, Lombard M, Galbraith R, *Gut Supplement*, S73-S78, 1991.
6. Berg PA, Homberg JC, et al. *Lancet*, October 10, 1981.
7. Manns M. *Journal of Hepatology Review*, **9**, 272-280, 1989.
8. Surh CD, Danner DJ, et al. *Hepatology*, **9**, 1, 63-68, 1989.
9. Gupta RC. *Clin Exp Immunol*, **59**, 604-612, 1985.
10. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. *Hepatology*, **5**, 5, 763-769, 1985.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

1. Diluir las muestras y los Controles Positivos y Negativos 1:101. No diluir los Control de Referencia.
2. Añadir 100µL de Control de Referencia por duplicado, muestras y Controles Negativos y Positivos prediluidos, en los vasos referenciados de la banda de microtitulación.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Lavar las bandas 3 veces.
5. Añadir 100µ of IgG/IgM de Conjugado a cada vaso.
6. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
7. Lavar las bandas 3 veces.
8. Añadir 100µL de Substrato a cada vaso.
9. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
10. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada vaso.
11. Leer la absorbencia a 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	M2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de M2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2 / M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di M2 e supporto per strip /M2-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-M2 Standards 1-5/ Etalons anti-M2 1-5 / Estandares Anti-M2 1-5 / Anti-M2 Standards 1-5 / Standard anti-M2 1-5 / Anti-M2-standarder
CONTROL REF	Anti-2 Reference Control/ Témoins de référence anti-M2 / Control de Referencia Anti-M2 / Anti-M2 Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-M2 / Anti-M2 referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

DEUTSCH: ANWENDUNGSGEBIETE

Der DIASTAT® Anti-Mitochondrien-Antikörper-Test ist ein qualitativer Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von IgG- und IgM-Autoantikörpern, die für das im Humanserum oder – plasma vorkommende M2-Antigen der Mitochondrienmembran spezifisch sind. Der Nachweis dieser Antikörper unterstützt die Diagnose der primären biliären Leberzirrhose und ist isoliert betrachtet nicht maßgebend. Die Autoantikörperspiegel stellen jedoch nur einen Parameter in einem sich aus vielen Kriterien zusammensetzenden diagnostischen Prozess dar.

EINLEITUNG

Die primäre biliäre Leberzirrhose ist eine chronische und nicht selten tödlich verlaufende cholestatische Autoimmunerkrankung der Leber, von der vorwiegend Frauen jungen bis mittleren Alters betroffen sind^{1,2}. Sie ist gekennzeichnet durch eine langsam fortschreitende Zerstörung der intrahepatischen Gallengänge, eine Entzündung der Leberpforte und Narbenbildung, die schließlich zu Leberzirrhose und Leberversagen führen.





Die Diagnose der primären biliären Leberzirrhose stützt sich auf die klinischen Manifestationen, biochemische Untersuchungen und den Nachweis im Blut zirkulierender Anti-Mitochondrien-Antikörper (AMA). Die histologische Untersuchung liefert die zur Bestätigung notwendigen Informationen und hilft, die Prognose zu beurteilen. Berichten ist zu entnehmen, daß AMA in mehr als 95% der durch Biopsie bestätigten Fälle von primärer biliärer Leberzirrhose vorhanden sind^{3,4} und in geringen Mengen auch bei Patienten mit anderen Erkrankungen^{4,5} sowie bei scheinbar gesunden Menschen^{6,7}. Es wurden auch krankheitsspezifische Subtypen von AMA identifiziert, die als spezifische und sensitive Marker für die primäre biliäre Leberzirrhose gelten. Bis heute hat man mehrere Autoantigene identifiziert⁸; von diesen gilt das M2-Antigen als spezifisch für die primäre biliäre Leberzirrhose^{4,9,10}. Es setzt sich aus zwei immunreaktiven Polypeptiden von ungefähr 70kD und 50kD zusammen und wurde als Bestandteil des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, einem wichtigen Mitochondrienenzym, erkannt^{4,10}.

Die Techniken, die heute zum Nachweis von AMA zur Verfügung stehen, sind die Immunfluoreszenzmessung, Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays und Immunoblots. Die am häufigsten verwendete Methode ist die Immunfluoreszenz auf HEp 2-Substrat, allerdings können die immunfluoreszenten Färbemuster unspezifisch sein und die Identifikation des Antigensubtyps somit erschweren. ELISAs zeichnen sich durch höhere Sensitivität, Unkompliziertheit und raschere Ergebnisse aus.

TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit einem M2-Antigen beschichtet. Während der ersten Inkubation binden sich im verdünnten Serum oder Plasma vorliegende spezifische Autoantikörper an die mit Antigen beschichtete Oberfläche. Die Vertiefungen werden dann zur Entfernung ungebundener Komponenten gewaschen. Bei der zweiten Inkubation heftet sich das Konjugat, ein gegen humanes IgG und IgM gerichteter Enzym-markierter Antikörper, an alle Oberflächen-gebundenen Autoantikörper. Nach weiterem Waschen werden spezifische Autoantikörper durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und führt zu einem farbigen Endprodukt. Die Menge des gebundenen Konjugats wird in Extinktionseinheiten gemessen und mit der von der Referenzkontrolle gebundenen Menge verglichen.

TESTKIT-REAGENZIEN

A	IgG/IgM-Konjugat	1 x 15mL	Mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper gegen Human-IgG und IgM, Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1% (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
B	Substrat	1 x 15mL	Mg ²⁺ , Phenolphthaleinmonophosphat (PMP), Pufferlösung. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern.	
C	Stopplösung	1 x 15mL	Natriumhydroxid, EDTA, Carbonatpuffer (pH >10). Gebrauchsfertig.	
D	Waschpuffer-konzentrat (16X)	2 x 25mL	Boratpuffer, 0,4% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
E	M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen	12 x 8 Streifen mit Mikrotitervertiefungen	Beschichtet mit M2 Antigen in einer wiederverschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel. Farbcode ROSA . Von jedem Mikrotiterstreifen können einzelne Markierungen abgebrochen werden.	
F	Probendiluens-Konzentrat (5X)	1 x 25mL	Phosphatpuffer, Proteinstabilisator, 0,5% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
6	Anti-M2-Referenzkontrolle	1 x 1.5mL	Humanplasma, Puffer, <0,1% (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
+/-	Positiv Kontrolle Negativ Kontrolle	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Humanplasma, <0,1% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch mit einem Probendiluens im Verhältnis 1:101 verdünnen, wie die Proben.	
	Packungsbeilage			

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Haltbarkeit des geöffneten Testkits

Ein Testkit wurde geöffnet und während einer dreimonatigen Periode dreimalig ohne nachteilige Wirkung auf die Kitleistung wieder verwendet.

Handhabungs- und Verfahrenshinweise

1. Die Testkit-Bestandteile bei 2-8° C lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum verwenden. Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus verwenden.
2. Reagenzien aus verschiedenen Testkit-Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden.
3. Testkits nicht einfrieren.
4. Waschpuffer-Konzentrat, Probendiluens-Konzentrat und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünntes Probendiluens sind bei 2-8° C bis zu 6 Monaten beständig, wenn eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
6. Überzählige Mikrotiterstreifen in die Folienpackung zurückgeben und mit dem Trockenmittel bis zum Gebrauch bei 2-8° C lagern.
7. Das Plattengestell ist nur zum Gebrauch mit einschnappbaren Vertiefungen geeignet.
8. Das Substrat während der Lagerung nicht der Lichteinwirkung aussetzen.
9. Die Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

Anzeichen einer Wertminderung

Das Substrat soll hellgelb aussehen. Eine Rosafärbung ist ein Anzeichen für eine Kontamination, und das Reagenz muss verworfen werden. Trübung oder Niederschlag in einem Bestandteil sind Anzeichen einer Wertminderung, und der Bestandteil muss verworfen werden.

Probensammlung und Aufbewahrung

Dieser Test wird für Serum-/Plasmaproben empfohlen. Lipämische, hämolysierte oder trübe Proben dürfen nicht verwendet werden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen, und erneutes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Proben nicht durch Erhitzen inaktivieren, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Die Proben können bei -20° C oder einer niedrigeren Temperatur aufbewahrt oder innerhalb von 12 Stunden nach der Entnahmen untersucht werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

**Nur für die Anwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.
Vorsichtsmaßnahmen**

1. Die Anleitungen in dieser Broschüre, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, strikt befolgen.
2. Die Kontrollen enthalten menschliches Plasma und wurden mit FDA-zugelassenen Assays auf Hepatitis-B-Surface-Antigen, HCV, HIV-Antigen und HIV-Antikörper getestet und als nicht reaktiv/negativ befunden. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen alle Kontrollen als potentiell infektiös angesehen und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien wie andere potentiell gefährliche biologische Materialien behandelt werden. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3. Auflage, 1993, beschreibt wie diese Materialien unter Beachtung der Good Laboratory Practice (GLP) zu handhaben sind. Dies trifft in den USA zu.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
5. Alle erkrankten Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und weitere Hautläsionen ausreichend schützen.
6. Kontrollen, Konjugat, Probendiluens-Konzentrat und Waschpuffer-Konzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohren unter Bildung hoch explosiver Metallazide reagieren kann. Zur Vermeidung einer Azidansammlung bei der Entsorgung mit reichlich Wasser wegspülen.
7. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Natriumhydroxid muss mit reichlich Wasser aufgewischt werden. Wenn Berührung mit Augen oder Haut auftritt, mit Wasser abspülen und sofort den Arzt konsultieren.
8. Das Substrat enthält PMP, Bronidox L und Dietanolamin. Kontakt mit Haut, Augen und Atemwege vermeiden. Bei Kontakt mit Haut, Augen oder Atemwege mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
9. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.



Achtung

B.

SUBS

Enthält: Dietanolamin

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Verursacht schwere Augenreizung. |
| P264: | Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen. |
| P280: | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden. |
| P305+P351+P338: | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. |
| P337+P313: | Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Achtung

Enthält: Natriumhydroxid

- H315: Verursacht Hautreizungen.
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P302+P352: BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P332+P313: Im Falle einer Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Achtung

Enthält: Natriumazid

- H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
 EUH032: Kontakt mit Säure setzt sehr giftige Gase frei.
 H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit lang anhaltender Wirkung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
 P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

VORBEREITUNG

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien/Geräte

1. Lesegerät mit 550 nm Filter (540-565 nm ist zulässig) für eine Platte/einen Streifen mit 96 Vertiefungen.
2. Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 µL, 100 µL und 1mL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 100 µL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 200 µL zum manuellen Waschen, wahlweise mit einem automatischen Plattenwäscher.
3. Glas-/Kunststoffmesszylinder: 1x100 mL, 1x400 mL.
4. Gefäße zur Aufnahme eines 1mL Volumens
5. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
6. Papiertücher.
7. Stoppuhr für 30 und 60 Minuten Intervalle.

Vorbereitung zur Testdurchführung

Alle Testkit-Bestandteile, einschließlich der Mikrotiterstreifen, vor Gebrauch 30-60 Minuten auf bis zu 18-25°C anwärmen Die Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen.

Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich mischen.

Reagenz	Volumen	Zugabe
Waschpuffer-Konzentrat	1 Flasche	375mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Probendiluens-Konzentrat	1 Flasche	100mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Positiv- und Negativ-Kontrollen/Proben	10 µL	1mL verdünntes Probendiluens

Mikrotitervertiefungen gibt es in Streifen mit je acht Vertiefungen. Wenn eine andere Einheit als je acht Vertiefungen benötigt wird, wie folgt vorgehen:

1. Den Streifen durch Drücken auf die Unterseite der Vertiefungen aus dem Rahmen nehmen.
2. Die benötigte Zahl von Vertiefungen abbrechen.
3. Das rechteckige Loch in die untere Kante (zu H) der Kerbe im Rahmen einhängen.
4. Sicherstellen, dass das Vierkantloch, mit Einkerbung auf der linken Seite, entlang der oberen Kante sicher festgehalten wird (Reihe A).

TESTPROTOKOLL

1. Referenzvertiefungen zum Nachweis.
2. 100µL Referenzkontrollen(Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Bitte denken Sie daran, zwischen den Zugaben die Pipettenspitzen zu wechseln. Dieser Schritt darf für die jeweilige Kontroll-/Probenreihe nicht länger als 15 Minuten dauern.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umkehren über einem für die Entsorgung biologischer Materialien geeigneten Spülbecken dekantieren, wobei die potentielle Infektionsgefahr der Proben zu berücksichtigen ist. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
5. Die Vertiefungen **dreimal** mit mindestens 200µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Dekantieren und nach jedem Waschschrift abtupfen.
6. In jede Vertiefung 100 µL IgG/IgM Konjugat geben.
7. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
8. Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. In jede Vertiefung 100 µL Substrat geben.
10. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren. Nicht dekantieren.
11. In der gleichen Reihenfolge und Rate wie für das Substrat in jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben. Die Vertiefungen durch vorsichtiges Beklopfen mischen.
12. Die Streifen innerhalb von 24 Stunden bei 550 nm (540-565 nm) ablesen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test getrennt auswerten.

Das Verhältnis des Extinktionswertes (optische Dichte) für die Positiv- und Negativ-Kontrollen und für jede Probe berechnen.

$$\text{Extinktionsverhältnis} = \frac{\text{Extinktionswert der Probe oder Kontrolle}}{\text{Mittelwert der Extinktion der Referenzkontrolle}}$$

Die Anwender müssen einen für ihre Patientenpopulationen spezifischen Cut-off-Wert zwischen den positiven und negativen Proben berechnen. Die Ergebnisse von den Patientenpopulationen, die an der von Euro Diagnostica durchgeführten klinischen Prüfung teilnahmen, deuten auf den folgenden Cut-off-Wert hin:

Extinktionsverhältnis

<0,95

≥0,95 bis ≤1,0

>1,0

Interpretation der Ergebnisse

Negativ

Borderline – Testwiederholung empfohlen

Positiv

QUALITÄTSKONTROLLE

Darauf achten, dass eine angemessene Instandhaltung und Kalibrierung des Plattenlesegerätes nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die richtige Wellenlänge angewendet wird. Die Laboratorien sollten sicherstellen, dass das Personal mit der Testanleitung, besonders aber den Abschnitten zu den Warnungs- und Vorsichtsmaßnahmen sowie den Handhabungs- und Verfahrenshinweisen vollkommen vertraut ist. Das Personal muss darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass es vor der Herausgabe der Patientenergebnisse Leistungsspezifikationen in Bezug auf die Präzision und den zu berichtenden Bereich der Testergebnisse erheben kann, die mit den von dem Hersteller vorgegebenen vergleichbar sind. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens wird empfohlen, dass die vorverdünnten Positiv- und Negativkontrollen in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen. Bei allen Tests muss die gebrauchsfertige Referenzkontrolle als Doppelbestimmung mitlaufen. Vorausgesetzt, dass die vom Hersteller beschriebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt werden, ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht herausgegeben werden, wenn eine Kontrolle nicht den unten angegebenen Kontrollverhältnis-Spezifikationen entspricht. Der Test kann nach Überprüfung des Verfahrens oder Kontaktaufnahme mit dem Händler/Hersteller wiederholt werden. Bei Wiederholung des Tests eine frische Verdünnung von jeder Kontrolle und der Probe herstellen. Einige Laboratorien möchten bei jedem Testdurchlauf gegebenenfalls auch ihre laboreigenen Kontrollen mitlaufen lassen. Dieses Kontrollmaterial muss bei oder unter -20°C aufbewahrt werden, wobei wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden sind. Die Ergebnisse der Proben werden durch Konservierungsmittel, wie zum Beispiel Natriumazid (0,1% (w/v)) nicht beeinflusst. Bei den Konzentrationen von Analyten, die bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden, handelt es sich um diejenigen, die von dem Hersteller für spezifische Populationen vorgegeben werden und stimmen nicht unbedingt mit den in der Literatur angegeben überein. Inzidenz-Grade, ihr Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen, Referenzbereiche und geeignete Cut-off-Punkte sind von dem jeweiligen Laboratorium für die von ihnen betreuten spezifischen Populationen zu berechnen.

Kontrollverhältnis-Spezifikationen	
Extinktion für die Positive Kontrolle	Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle
Extinktion der Referenzkontrolle	
Extinktion für die Negativ Kontrolle	<1,0
Extinktion der Referenzkontrolle	

ERWARTETE WERTE

Serumproben wurden von Referenzzentren und asymptomatischen gesunden Personen gewonnen. Bei einem Verhältnis von Probe zu Referenzkontrolle von <1 als Cut-off waren mehr als 99% der asymptomatischen Population negativ für Anti-Mitochondrien-IgG- und -IgM-Antikörper. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verteilung der Ergebnisse in spezifischen Krankheitsgruppen.

Kontroll- und Krankheitsgruppen	n	% Positiv bei einem Verhältnis von Probe zu Referenzkontrolle > 1
Asymptomatisch, gesund	193	0,5
Primäre biliäre Leberzirrhose	72	95,8
Anti-Centromer-Antikörper positiv	17	11,8
Systemischer Lupus erythematodes	62	3,2
Chronische aktive Hepatitis	5	-
Sklerodermie	18	-
Sjögren-Syndrom	21	-
Virusinfektions	23	-
Rheumatoide Arthritis	19	-
Polymyositis	23	-

ANWENDUNGSGRENZEN


1. Obgleich das Vorliegen hoher Antikörpertiter gegen das M2-Antigen auf eine primäre biliäre Leberzirrhose hindeutet, dürfen diese Parameter nur zusammen mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden in Betracht gezogen werden.
2. Bei einigen Patienten können hohe Anti-M2-Antikörperspiegel mit wenig oder keinen Hinweisen auf eine klinische Erkrankung vorliegen. Andererseits können bei einigen Patienten mit primärer biliärer Leberzirrhose nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper vorhanden sein.
3. Für eine wiederholte Probengewinnung vom Patienten, wie zum Beispiel zur Überwachung, ist die gesamte Studienperiode über immer der gleiche Probentyp (Serum oder Plasma) zu verwenden.

LITERATUR

1. Kaplan MM. *New England Journal of Medicine*, **316**, 9, 521-529, 1987.
2. Powell FC, Schroeter AL, Dickson ER. *Quarterly Journal of Medicine*, New Series 62, **237**, 75-82, 1987.
3. Kyriatsoulis A, Manns M, et al. *J Immun Methods*, **109**, 113-121, 1988.
4. McHugh NJ, James IE, et al. *Clin Exp Immunol*, **81**, 244-249, 1990.
5. Neuberger J, Lombard M, Galbraith R, *Gut Supplement*, S73-S78, 1991.
6. Berg PA, Homberg JC, et al. *Lancet*, October 10, 1981.
7. Manns M. *Journal of Hepatology Review*, **9**, 272-280, 1989.
8. Surh CD, Danner DJ, et al. *Hepatology*, **9**, 1, 63-68, 1989.
9. Gupta RC. *Clin Exp Immunol*, **59**, 604-612, 1985.
10. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. *Hepatology*, **5**, 5, 763-769, 1985.

ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

1. Die Proben und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen im Verhältnis 1:101 verdünnt werden. Referenzkontrolle nicht verdünnen.
2. 100µL Referenzkontrolle (Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und Proben in die entsprechend gekennzeichneten Vertiefungen des Mikrotiterstreifens geben.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Streifen 3-mal waschen.
5. In jede Vertiefung 100 µL IgG/IgM Konjugat geben.
6. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
7. Streifen 3-mal waschen.
8. In jede Vertiefung 100µL Substrat geben.
9. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
10. In jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben.
11. Extinktion bei 550 nm ablesen.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	M2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de M2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2 / M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di M2 e supporto per strip /M2-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-M2 Standards 1-5/ Etalons anti-M2 1-5 / Estandares Anti-M2 1-5 / Anti-M2 Standards 1-5 / Standard anti-M2 1-5 / Anti-M2-standarder
CONTROL REF	Anti-2 Reference Control/ Témoins de référence anti-M2 / Control de Referencia Anti-M2 / Anti-M2 Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-M2 / Anti-M2 referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

ITALIANO: INDICAZIONI PER L'USO

Il test antimitocondri DIASTAT® è un dosaggio immunoenzimatico quantitativo/qualitativo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) per la rivelazione degli autoanticorpi IgG e IgM specifici verso l'antigene M2 della membrana mitocondriale nel siero o plasma umano. La rivelazione di questi autoanticorpi è un valido aiuto nella diagnosi della cirrosi biliare primaria e, da solo, non va considerato definitivo. I livelli autoanticorpali rappresentano uno dei parametri del processo diagnostico a più criteri.

INTRODUZIONE

La cirrosi biliare primitiva (PBC) è una malattia autoimmune, colestatica, del fegato, spesso ad esito infausto, che colpisce le donne di giovane o mezza età^{1,2}. È caratterizzata da degenerazione lenta, progressiva dei dotti biliari intraepatici, da infiammazione e fibrosi portale e, infine, cirrosi e insufficienza epatica.





La PBC viene diagnosticata sulla base di manifestazioni cliniche, test biochimici e rivelazione degli anticorpi antimitocondriali (AMA) circolanti, e confermata dall'esame istologico, che è utile ai fini prognostici. Si è osservata la presenza degli anticorpi AMA in oltre il 95% di PBC, confermata da esame bioptico^{3,4} e, a bassi livelli, nei pazienti affetti da altre malattie^{4,5} e in soggetti apparentemente sani^{6,7}. Al momento attuale, sono stati identificati numerosi autoantigeni⁸, dei quali si ritiene che l'antigene M2 sia specifico alla PBC^{4,9,10}. Questo antigene consiste di due polipeptidi immunoreattivi di circa 70kD e 50kD; è stato identificato come parte del complesso piruvato deidrogenasi, un importante enzima mitocondriale^{4,10}.

Le tecniche attualmente disponibili per la rivelazione degli AMA comprendono l'immunofluorescenza, il dosaggio radioimmunologico, il dosaggio immunoenzimatico e l'immunoblotting. L'immunofluorescenza su substrato di HEp2 è attualmente il metodo impiegato con maggior frequenza, tuttavia la colorazione dei pattern può essere aspecifica, rendendo difficile l'identificazione del sottotipo antigenico. I test ELISA, per contro, sono più sensibili, più semplici e danno risultati più rapidi.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con l'antigene M2. Durante la prima incubazione, gli autoanticorpi specifici nel siero o plasma diluito si legano con la superficie rivestita con antigene; i pozzetti sono quindi lavati per rimuovere i componenti non legati. Nella seconda incubazione, il coniugato - anticorpi, marcati con un enzima, verso le IgG e le IgM umane - si lega a qualsiasi autoanticorpo adeso alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, gli autoanticorpi specifici vengono tracciati per incubazione con il substrato. L'aggiunta della soluzione bloccante pone fine alla reazione, generando un prodotto finale colorato. La quantità di coniugato legato viene misurata in unità di assorbanza e quindi rapportata contro quello legato dal controllo di riferimento.

COMPONENTI DEL KIT

A	Coniugato IgG/IgM	1 x 15mL	Anticorpi, marcati con fosfatasi alcalina per le IgG e IgM umane, tampone Tris, stabilizzante delle proteine, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso.	
B	Substrato	1 x 15mL	Mg ²⁺ , fenoltaleina monofosfato (PMP), soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare evitando l'esposizione alla luce.	
C	Soluzione bloccante	1 x 15mL	Idrossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH >10). Pronta all'uso.	
D	Tampone di lavaggio concentrato (16X)	2 x 25mL	Tampone borato, azide di sodio 0,4% (p/v). Diluire prima dell'uso.	
E	Pozzetti rivestiti con M2 e supporto per strip	8 pozzetti di microtitolazione da 12 strip	Rivestiti con M2, in confezione di alluminio risigillabile con essiccante. Codice a colori: ROSA . I singoli pozzetti possono essere staccati da ciascuna strip di microtitolazione.	
F	Diluyente per campioni concentrato (5X)	1 x 25mL	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine, azide di sodio 0,5% (p/v). Diluire prima dell'uso.	
6	Controllo di riferimento anti-M2	1 x 1,5mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso.	
+/-	Controllo positivo Controllo negativo	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Plasma umano, azide di sodio <0,1% (p/v). Diluire 1:101 con il diluyente per campioni diluito prima dell'uso, come per i campioni.	
	Foglio illustrativo			

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Stabilità del kit aperto

Un kit è stato aperto e utilizzato in tre occasioni, in un periodo di tre mesi, con nessun segno di deterioramento prestazionale.

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non miscelare componenti appartenenti a lotti di numero diverso.
3. Non congelare i kit.
4. Prima dell'uso, diluire il tampone di lavaggio concentrato, il diluyente per campioni concentrato e i controlli positivi e negativi. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Una volta diluiti, il tampone di lavaggio e il diluyente per campioni sono stabili a temperature comprese tra 2° C e 8° C per un periodo massimo di 6 mesi, in assenza di contaminazione microbica.
6. Riporre le strip di microtitolazione inutilizzate nella confezione di alluminio, contenente essiccante, e conservare a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino al momento dell'uso.
7. Il supporto della piastra è stato adattato per essere usato solo con i pozzetti staccabili.
8. Conservare il substrato senza esporlo alla luce.
9. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.

Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere di colore giallo pallido. Una colorazione rosa è indice di contaminazione e il reagente va smaltito. La torbidità o la precipitazione di un componente qualsiasi è indice di deterioramento e il componente va smaltito.

Raccolta e conservazione dei campioni

Il dosaggio è indicato per i campioni di siero o plasma; non utilizzare campioni lipemici, emolizzati o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del test; evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Non inattivare mediante calore i campioni, per evitare di ottenere falsi positivi. I campioni possono essere conservati a temperature eguali o inferiori a -20° C, oppure analizzati entro 12 ore dal prelievo.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per solo uso diagnostico *in vitro*.

Precauzioni di sicurezza

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. I controlli contengono plasma umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'antigene di superficie per il virus dell'epatite B, l'antigene per il virus dell'epatite C, l'antigene e gli anticorpi dell'HIV e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopericolosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3^a edizione, 1993, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo non è applicabile negli Stati Uniti d'America.
3. Non pipettare con la bocca
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. I controlli, il coniugato, il diluente per campioni concentrato e il tampone di lavaggio concentrato contengono azide di sodio, che reagisce con tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Smaltire negli scarichi con acqua abbondante per evitare l'accumulo di azide.
7. La soluzione bloccante contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Eventuali spandimenti vanno mescolati con acqua abbondante e raccolti con materiale assorbente. Se viene a contatto con la pelle o gli occhi, irrigare con acqua e rivolgersi immediatamente al medico.
8. Il substrato contiene PMP, Bronidox L e dietanolamina. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e il sistema respiratorio. In caso di contatto con queste parti risciacquare con acqua e consultare un medico.
9. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.

B.



Attenzione

SUBS

Contiene: Dietanolamine

- | | |
|-----------------|--|
| H319: | Provoca grave irritazione oculare. |
| P264: | Lavare accuratamente le mani dopo l'uso. |
| P280: | Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. |
| P305+P351+P338: | IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. |
| P337+P313: | Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. |



C.

SOLN	STOP
------	------

Attenzione

Contiene: Idrossido di sodio

H315:	Provoca irritazione cutanea.
H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti.
P332+P313:	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attenzione

Contiene: Azide di sodio

H302:	Nocivo se ingerito.
EUH032:	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
H412:	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso..
P301+P312:	IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P273:	Non disperdere nell'ambiente.

PREPARAZIONE

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

1. Lettore per piastra da 96 pozzetti/strip con filtro da 550nm (540-565nm è accettabile).
2. Pipette di precisione per dispensare 10µL, 100µL, 1mL. Pipetta automatica per dispensare 100µL. Pipetta automatica per dispensare 200µL per il lavaggio manuale. Lavapietra automatica opzionale.
3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1x100mL, 1x400mL.
4. Contenitore di 1mL di volume.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette assorbenti di carta.
7. Timer per intervalli di 30 e 60 minuti.

Preparazione del dosaggio

Prima dell'uso, lasciar riscaldare i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, fino a temperature comprese tra 18° C e 25° C per 30-60 minuti. Miscelare delicatamente i reagenti per inversione.

Non diluire il controllo di riferimento.

Diluire i seguenti reagenti e miscelare accuratamente.

Reagente	Volume	Aggiungere
Tampone di lavaggio concentrato	1 flaconcino	375mL di acqua distillata/deionizzata.
Diluyente per campioni concentrato	1 flaconcino	100mL di acqua distillata/deionizzata.
Controlli positivi e negativi/campioni	10µL	1mL di diluyente per campioni diluito

I pozzetti di microtitolazione sono forniti in strip di otto. Nel caso in cui fossero necessari pozzetti in numero superiore a multipli di otto, eseguire quanto segue:

1. Rimuovere la strip dal supporto spingendo sulla parte inferiore dei pozzetti.
2. Staccare il numero di pozzetti voluto.
3. Inserire il foro rettangolare nel bordo inferiore (H) della scanalatura del supporto.
4. Verificare che il foro quadrato, con la tacca alla sinistra, sia posizionato saldamente lungo il bordo superiore (riga A).

P R O T O C O L L O P E R I L D O S A G G I O

1. Marcare i pozzetti per l'identificazione.
2. Dispensare con la pipetta 100µL di controllo di riferimento in duplicato, i controlli positivo e negativo prediluiti e i campioni prediluiti dei pazienti negli appositi pozzetti. Ricordarsi di cambiare il puntale della pipetta ad ogni aggiunta di volumi. Questa operazione non deve richiedere più di 15 minuti per un ogni serie di controlli/campioni.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Decantare il contenuto delle strip per inversione rapida in un lavello idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale infettivo dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta assorbente.
5. Lavare i pozzetti tre volte con almeno 200µL di tampone di lavaggio diluito. Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.
6. Aggiungere 100µL di coniugato IgG/IgM in ciascun pozzetto.
7. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità del substrato. Picchiettare delicatamente i pozzetti per miscelare.
12. Leggere le strip entro 24 ore a 550nm (540-565nm).

C A L C O L O E I N T E R P R E T A Z I O N E D E I R I S U L T A T I

Valutare ciascun saggio separatamente per calcolare e interpretare i risultati.

Calcolare il rapporto del valore di assorbanza (densità ottica) per i controlli positivi e negativi e per ciascun campione.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{valore d'assorbanza del campione o controllo}}{\text{valore medio d'assorbanza del controllo di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare il valore di normalità (punto di cut-off) tra campioni positivi e negativi, che sia specifico alla loro popolazione di pazienti. I risultati ottenuti dalle popolazioni di pazienti, adottate negli studi clinici condotti da Euro Diagnostica, suggeriscono i seguenti valori di normalità:

Rapporto di assorbanza

<0,95

≥da 0,95 a ≤1,0

>1,0

Interpretazione dei risultati

Negativo

Valore borderline: si consiglia di ripetere il test

Positivo

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Verificare che la manutenzione e calibrazione del lettore di piastre vengano eseguite in modo adeguato e in conformità alle istruzioni del costruttore, e che venga impiegata la lunghezza d'onda corretta. Gli operatori devono accertarsi di aver compreso appieno le istruzioni per il dosaggio, in particolare per quanto concerne le avvertenze, le precauzioni e le annotazioni sulla manipolazione e la procedura. Inoltre, prima di riferire i risultati dei test al paziente, gli operatori devono aver dimostrato di essere in grado di ottenere specifiche prestazionali, in termini di precisione e di intervallo riportabile dei risultati, equiparabili a quelle stabilite dal costruttore. Si consiglia di effettuare i controlli positivo e negativo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi, al fine di monitorare la qualità della procedura. Eseguire il controllo di riferimento, pronto per l'uso, in duplicato per tutti i dosaggi.

Presupponendo che le specifiche di precisione descritte dal costruttore siano soddisfatte, qualora un controllo qualsiasi non soddisfi le specifiche del rapporto di controllo riportate di seguito, il dosaggio va considerato non valido e non va riportato. L'operatore può ripetere il dosaggio, dopo aver riesaminato la tecnica operativa seguita, oppure rivolgersi al distributore o costruttore. Se il dosaggio viene ripetuto, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. Per ciascuna serie analitica, i laboratori possono scegliere di includere i propri controlli interni. Conservare i materiali di controllo a temperature pari o inferiori a -20° C; evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. I preservanti, come l'azide di sodio a 0,1% (p/v), non incidono in alcuna misura sui risultati dei campioni.

I livelli degli analiti identificati in patologie specifiche sono quelli stabiliti dal costruttore per popolazioni specifiche, per il qual motivo è possibile che non riflettano quanto riportato nella letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, gli intervalli di riferimento e i valori di normalità appropriati devono essere calcolati per le popolazioni specifiche servite dagli operatori.

Specifiche del rapporto di controllo	
Assorbanza controllo positivo	vedere l'etichetta del controllo positivo
Assorbanza controllo di riferimento	
Assorbanza controllo negativo	<1,0
Assorbanza controllo di riferimento	

VALORI ATTESI

Campioni sierici sono stati raccolti da centri di riferimento e prelevati da soggetti sani asintomatici. Utilizzando quale valore di normalità (cut-off) il rapporto campione/controllo di riferimento di <1, oltre il 99% della popolazione asintomatica presentava negatività verso gli anticorpi IgG e IgM antimitocondri. La distribuzione dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Gruppi di controllo e malattia	n	% di positivi utilizzando il rapporto campione/controllo di riferimento > 1
Sano asintomatico	193	0,5
Cirrosi biliare primitiva	72	95,8
Positività per anticorpi anticentromero	17	11,8
Lupus eritematoso sistemico	62	3,2
Epatite attiva cronica	5	-
Sclerodermia	18	-
Sindrome di Sjögren	21	-
Infezioni virali	23	-
Artrite reumatoide	19	-
Polimiosite	23	-

LIMITI D'IMPIEGO

1. Sebbene la presenza di titoli elevati di anticorpi verso l'antigene M2 sia indice di cirrosi biliare primaria, i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. In alcuni soggetti possono essere presenti elevati livelli di anticorpi anti-M2 con scarsa o nessuna evidenza della patologia clinica. Per contro, in alcuni pazienti affetti da PBC, i livelli di questi anticorpi possono essere non rivelabili.
3. Nel caso di analisi ripetute sui campioni dei pazienti, ad es. per monitoraggio, utilizzare lo stesso tipo di campione (siero o plasma) per l'intera durata del periodo di studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaplan MM. *New England Journal of Medicine*, **316**, 9, 521-529, 1987.
2. Powell FC, Schroeter AL, Dickson ER. *Quarterly Journal of Medicine*, New Series 62, **237**, 75-82, 1987.
3. Kyriatsoulis A, Manns M, et al. *J Immun Methods*, **109**, 113-121, 1988.
4. McHugh NJ, James IE, et al. *Clin Exp Immunol*, **81**, 244-249, 1990.
5. Neuberger J, Lombard M, Galbraith R, *Gut Supplement*, S73-S78, 1991.
6. Berg PA, Homberg JC, et al. *Lancet*, October 10, 1981.
7. Manns M. *Journal of Hepatology Review*, **9**, 272-280, 1989.
8. Surh CD, Danner DJ, et al. *Hepatology*, **9**, 1, 63-68, 1989.
9. Gupta RC. *Clin Exp Immunol*, **59**, 604-612, 1985.
10. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. *Hepatology*, **5**, 5, 763-769, 1985.

RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

1. Diluire i campioni e i controlli positivo e negativo 1:101. Non diluire controllo di riferimento.
2. Aggiungere 100µL di controllo di riferimento in duplicato, i controlli positivo e negativo e i campioni prediluiti nei pozzetti marcati della strip di microtitolazione.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Lavare le strip 3 volte.
5. Aggiungere 100µL IgG/IgM di coniugato in ciascun pozzetto.
6. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
7. Lavare le strip 3 volte.
8. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
9. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
10. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
11. Leggere l'assorbanza a 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	M2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de M2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2 / M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di M2 e supporto per strip /M2-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-M2 Standards 1-5/ Etalons anti-M2 1-5 / Estandares Anti-M2 1-5 / Anti-M2 Standards 1-5 / Standard anti-M2 1-5 / Anti-M2-standarder
CONTROL REF	Anti-2 Reference Control/ Témoins de référence anti-M2 / Control de Referencia Anti-M2 / Anti-M2 Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-M2 / Anti-M2 referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

SVENSKA: AVSEDD ANVÄNDNING

DIASTAT[®] testkit anti-mitokondria är ett kit för kvalitativ enzymkopplad immunosorbentanalys (ELISA) för detektion av IgG/IgM-autoantikroppar specifika för M2-antigenet i det mitokondriella membranet i humant serum eller plasma. Detektion av dessa antikroppar är ett användbart hjälpmedel vid diagnos av primär biliär cirros (PBC). Testet kan inte användas som ensamt diagnostiskt hjälpmedel. Mängden autoantikroppar är bara en parameter i en diagnostisk process baserad på ett antal kriterier.

INLEDNING

Primär biliär cirros (PBC), en kronisk och ofta dödlig kolestatisk autoimmun leversjukdom som angriper unga till medelålders kvinnor (1,2). Sjukdomen karakteriseras av en långsam progressiv förstöring av intrahepatiska gallgångar, portalinflammation och ärrbildning, som så småningom leder till cirros och leversvikt.

Diagnosen baseras på kliniska manifestationer, biologiska tester och detektering av cirkulerande antikroppar mot mitokondrier (AMA). Histologisk undersökning ger bekräftande information och är till hjälp vid fastställandet av prognosen. AMA rapporteras vara närvarande i mer 95 % av patienter med biopsibevisad PBC (3,4). Dessa antikroppar har också observerats vid låga nivåer hos patienter med andra sjukdomar och hos till synes friska individer (4,6-8).





Sjukdomsspecifika undertyper av AMA har identifierats och anses som specifika och känsliga markörer för PBC. Hitintills har åtskilliga autoantigener identifierats och av dessa tros M2-antigenet vara specifikt för PBC (4,5,9,10). Det består av två immunoreaktiva polypeptider på ungefär 70 kD och 50 kD och har identifierats som del av pyruvatdehydrogenaskomplexet, ett större mitokondriellt enzym (4,10).

Nuvarande tekniker tillgängliga för detektering av AMA innefattar immunofluorescens, radioimmunanalys, enzymimmunanalys och immunoblotting. Den vanligast använda metoden är immunofluorescens på HEp-2-substrat. Immunofluorescensfärgmönster kan vara ickespecifika och identifiering av antigen-undertyp är svår. ELISA däremot ger ökad känslighet, är enkel att använda och ger snabbt resultat.

ANALYSPRINCIP

Brunnarna i mikrotiterstripsen är belagda med M2-antigen. Under den första inkubationen binder specifika autoantikroppar i utspätt serum eller plasma till den antigenbelagda ytan. Därefter tvättas brunnarna, så att ej bundna komponenter avlägsnas. I den andra inkubationen binder konjugatet, som innehåller enzymerkädda antikroppar mot humant IgG och IgM, till de eventuella autoantikroppar som bundits till ytan. Efter ytterligare en tvättning spåras de specifika autoantikropparna genom inkubering med substratet. När stopplösningen tillsätts avbryts reaktionen och en färgad slutprodukt erhålls. Mängden konjugat som bundits är korrelerad till den uppmätta absorbansen. Mängden konjugat som bundits mäts i absorbansenheter och jämförs med den mängd som bundits för referenskontrollen.

KOMPONENTER I TESTKITET

A	IgG/IgM-konjugat	1 x 15 mL	Antikroppar mot humant IgG/IgM, som är konjugerade med alkaliskt fosfat, tris-buffert, proteinstabilisator, <0,1% (m/v) natriumazid. Klar att använda.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , fenolftaleinmonofosfat (PMP), buffert. Klar att använda. Förvaras mörkt.	
C	Stopplösning	1 x 15 mL	Natriumhydroxid, EDTA, karbonatbuffert (pH >10). Klar att använda.	
D	Koncentrerad (16x) tvättbuffert	2 x 25 mL	Boratbuffert, 0,4% (m/v) natriumazid. Spädes före användning.	
E	M2-belagda brunnar samt striphållare	Plattor med 12x8 mikrotiterbrunnar	Belagda med M2-antigen, förpackade i återförslutbar folieförpackning tillsammans med torkmedel. Färgkodade ROSA. Enskilda brunnar kan brytas loss från mikrotiterstripet.	
F	Koncentrerad spädvätska (5x)	1 x 25 mL	Fosfatbuffert, proteinstabilisator, 5% (v/v) Triton X-100, 0,5% (m/v) natriumazid. Spädes före användning.	
6	Anti-M2 referenskontroll	1 x 1,5 mL	Human plasma, buffert, <0,1% (m/v) natriumazid. Klar att använda.	
+/-	Positiv kontroll negativ kontroll	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Human plasma, <0,1% (m/v) natriumazid. Spädes 1:101 med utspädd spädvätska före användning, på samma sätt som patientproven.	
	Bruksanvisning			

FÖRVARING

Hållbarhet efter öppnandet

Ett kit öppnades och återvändes vid tre tillfällen under en tremånadersperiod utan försämring av egenskaperna.

Hantering och förfarande

1. Lagra komponenterna vid 2-8° C. Använd inte någon komponent efter det utgångsdatum som anges på etiketten.
2. Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
3. Frys inte komponenterna.
4. Glöm inte att späda koncentrerad tvättbuffert, spädvätska och positiva och negativa kontroller före användning. De övriga komponenterna är klara att använda.
5. Tvättbuffert och spädvätska för prov är stabila efter utspädning under upp till 6 månader, om de förvaras vid 2-8° C och inte kontamineras med mikroorganismer.
6. Lägg tillbaka oanvända mikrotiterstrips i folieförpackningen och förvara vid 2-8° C tillsammans med torkmedlet, tills produkten skall användas på nytt.
7. Striphållaren är utformad för strips med lossbrytbara brunnar.
8. Utsätt ej substratet för ljus under förvaring.
9. Undvik att kontaminera reagensen. Använd en ny engångspipett för varje pipettering av reagens respektive prov.

Tecken på försämrade egenskaper

Substratet skall ha blekgul färg. Om färgen är skär har substratet kontaminerats och måste kasseras. Grumlighet eller fällning i någon komponent innebär att komponenten inte längre är i fullgott skick och måste kasseras.

Provtagning och provförvaring

Analysen är avsedd för serumprov eller plasmaprov; använd inte prov som är lipemiska, hemolyserade eller grumliga. Blanda upptinade prov omsorgsfullt före analysen, och undvik upprepad frysning/tining. Värmeinaktivera inte proven, eftersom detta kan orsaka falskt positiva svar. Proven ska förvaras utspädda vid -20° C eller lägre eller analyseras inom 12 timmar efter provtagningen.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSMÅTT

Avsett endast för *in vitro* diagnostik.

Försiktighetsmått

1. Följ anvisningarna i den här texten noggrant, särskilt i fråga om hantering och lagring.
2. Kontrollerna innehåller human plasma som testats med FDA-godkända metoder för analys av hepatit B-antigen, HCV-, HIV-1- och HIV-2-antikroppar, och som därvid befunnits negativa. Eftersom det inte finns någon känd testmetod som garanterar att inga infektiösa agens förekommer ska kontrollerna behandlas som potentiellt infektiösa, och hanteras med samma försiktighet som annat potentiellt farligt material. I manualen från CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3e upplagan 1993, beskrivs hur sådana material bör hanteras enligt god laboratoriesed. Denna gäller i USA.
3. Pipettera inte med munnen.
4. I områden där kitet eller proven hanteras får ingen rökning, förtäring eller sminkning förekomma.
5. Alla hudskador som skärsår, skrubbsår osv skall skyddas på lämpligt sätt.
6. I kontrollerna, konjugatlösningen, spädvätskan och tvättbufferten ingår natriumazid, som kan reagerar med bly och koppar och därvid ge upphov till explosiva metallazider. När vätskorna spolas ut i vask skall de spädas med stora mängder vatten för att förhindra att azider ansamlas.
7. Stopplösningen innehåller natriumhydroxid. Undvik kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Spill bör samlas upp med stora mängder vatten. Om vätskan kommer i kontakt med huden eller ögonen sköljs den exponerade ytan med vatten och kontakt tas med läkare omedelbart.
8. Substratet innehåller PMP, Bronidox L och dietanolamin. Undvik kontakt med hud, ögon och andningsorgan. Om kontakt med hud, ögon eller andningsorgan, skölj med vatten och sök medicinsk hjälp.
9. På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.



Varning

B.

SUBS

Innehåller: Dietanolamin

- | | |
|-----------------|---|
| H319: | Orsakar allvarlig ögonirritation. |
| P264: | Tvätta händerna grundligt efter användning. |
| P280: | Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. |
| P305+P351+P338: | VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. |
| P337+P313: | Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp. |



Varning

C.

SOLN	STOP
------	------

Innehåller: Natriumhydroxid

H315:	Irriterar huden.
H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352:	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P332+P313:	Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.



Varning

D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Innehåller: Natriumazid

H302:	Skadligt vid förtäring.
EUH032:	Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
H412:	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P301+P312:	VID FÖRTÄRING: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår dåligt.
P273:	Undvik utsläpp till miljön.

F Ö R B E R E D E L S E R

Material/utrustning som behövs men som inte medföljer

1. Avläsare med filter för 550 nm, för avläsning av plattor med 96 provbrunnar (avläsning vid 540-565 nm kan accepteras).
2. Precisionspipetter, engångs, 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatisk pipett för dosering av 100 µL. Automatisk pipett för dosering av 200 µL vid manuell tvättning; automatisk platttvättare kan användas.
3. Mätcylinder av glas/plast: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Behållare med volymen 1 mL.
5. Destillerat/avjoniserat vatten.
6. Pappershanddukar.
7. Timer för intervall om 30 och 60 minuter.

Förberedelser för analysen

Låt alla komponenter i kitet, inklusive mikrotiterstripsen, anta en temperatur på 18-25° C, under 30 - 60 minuter före användning. Blanda reagensen genom försiktig vändning upp och ned.
Späd inte referenskontrollen.

Späd följande reagens och blanda omsorgsfullt.

Reagens	Volym	Tillsätt
Koncentrerad tvättbuffert	1 flaska	375 mL destillerat/avjoniserat vatten
Koncentrerad spädvätska	1 flaska	100 mL destillerat/avjoniserat vatten
Positiva och negativa kontroller/analysprov	10 µL	1 mL utspädd spädvätska

Brunnarna för mikrotitrering tillhandahålls i strips om åtta brunnar. Om något antal än en multipel med åtta skall användas gör man så här:

1. Lossa stripen från hållaren genom att trycka underifrån.
2. Bryt loss det antal brunnar som behövs.
3. Haka fast det rektangulära hålet vid nederkanten (rad H) på hållarens spår.
4. Se till att det kvadratiska hålet, med hacket till vänster, sitter ordentligt fast vid överkanten (rad A).

ANALYSFÖRFARANDE

1. Gör ett schema över brunnarna för identifiering.
2. Pipettera 100 µL referenskontroll i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller samt patientprov i respektive brunnar. Kom ihåg att byta pipettspets mellan pipetteringarna. Detta steg bör inte få ta mer än 15 minuter för varje uppsättning av kontroller och patientprov.
3. Inkubera under 60±10 minuter vid 18-25° C.
4. Dekantera innehållet i brunnarna genom att snabbt vända plattan upp och ned över en avloppsvask som är godkänd för biologiska vätskor. Tänk på att proven kan vara infektiösa. Sug upp restfukt från de tömda plattorna med pappershandukar.
5. Tvätta brunnarna **tre gånger** med minst 200 µL utspädd tvättbuffert. **Häll av och sug upp restfukt efter varje tvättning.**
6. Tillsätt 100 µL IgG/IgM-konjugat till varje brunn.
7. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
8. Upprepa stegen 4 och 5.
9. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
10. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C. **Häll inte av vätskan.**
11. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn, i samma ordning och med samma takt som tillsatsen av substrat. Knacka försiktigt på brunnarna för att blanda.
12. Avläs plattorna vid 550 nm (540-565 nm) inom 24 timmar.

BERÄKNINGAR OCH BEDÖMNING AV RESULTATET

Vid beräkning och bedömning av resultatet skall varje analys behandlas separat.

Kvalitativ analys

Beräkna absorbanskvoten (optisk täthet) för de positiva och negativa kontrollerna och för patientproven.

$$\text{Absorbanskvoten} = \frac{\text{Absorbansvärdet för patientprov eller kontroll}}{\text{Medelvärde av absorbansvärdet för referenskontrollen}}$$

Användaren bör beräkna en gräns mellan positiva och negativa prov som är specifik för den aktuella patientpopulationen. Resultatet från de patientpopulationer som medverkat vid Euro Diagnostics kliniska studier indikerar följande gränser:

Absorbanskvot

<0.95
 ≥0.95 till ≤1.0
 >1.0

Bedömning av resultatet

negativ
 gränsfall - analysen bör göras om
 positiv

KVALITETSSÄKRING

Se till att plattavläsaren får föreskrivet underhåll och kalibreras enligt tillverkarens anvisningar. Kontrollera att rätt våglängd används.

Användarna bör se till att de är helt införstådda med analysanvisningarna, särskilt avsnittet Varningar och försiktighetsmått, liksom med beskrivningen av hantering och förfarande. Användarna bör kunna visa att de kan uppnå värden i fråga om precision och rapporterbara intervall för analysresultaten som kan jämföras med tillverkarens uppgifter, innan resultat från analys av patientproven rapporteras. Det är lämpligt att dubblera förutspädda positiva och negativa kontroller vid alla analyser, för att därigenom kunna kontrollera testproceduren. Sätt den användningsklara referenskontrollen i två brunnar vid alla kvalitativa analyser.

Förutsatt att de precisionsvärden som tillverkaren uppger kan uppnås, måste varje analys förkastas där någon av kontrollerna faller utanför specifikationerna nedan. Sådana analysresultat skall inte rapporteras. Användaren kan upprepa analysen efter granskning av sina rutiner, eller kontakta leverantören/tillverkaren. Vid förnyad analys skall nya spädningar göras av respektive kontroller och patientprov. Laboratorierna kan vilja inkludera egna kontroller vid varje analys. Sådana kontroller skall förvaras vid -20° C eller lägre och bör inte omfrysas när de tinats. Konserveringsmedel som natriumazid i koncentrationen 0,1% (m/v) påverkar inte analysresultaten.

De nivåer av analyt som identifierats för olika sjukdomar är de som tillverkaren har fastställt för givna populationer, och behöver inte med säkerhet motsvara värden som anges i litteraturen. Prevalens, samband med specifika sjukdomar, referensintervall och lämpliga gränsvärden bör beräknas för den speciella patientpopulation som användaren betjänar.

Specifikationer för kontrollernas absorptionskvot

Specifikationer	
Absorbans positiv kontroll	se etikett för positiv kontroll
Absorbans referenskontroll	
Absorbans negativ kontroll	<1.0
Absorbans referenskontroll	

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Serumprover från referenskliniker insamlades och testades med DIASTAT® Anti-Mitochondrial Antibody Assay. Prover från asymtomatiska friska individer analyserades för närvaro av antikroppar mot mitokondrier. Vid användning av prov/referenskontroll kvot av < 1, visade mer än 99 % av den normala populationen negativt resultat för antimitokondriella IgG- och IgM-antikroppar. Fördelningen av antikroppar mot mitokondrier i specifika sjukdomsgrupper ges nedan.

Kontroll- och sjukdomsgrupper	n	% Positiv
Asymtomatisk normal	193	0,5
Primär biliär cirros	72	95,8
Positiv för antikroppar mot centromerer	17	11,8
SLE	62	3,2
Kronisk aktiv hepatit	5	0
Sklerodermi	18	0
Sjögrens syndrom	21	0
Virusinfektion	23	0
Reumatoid artrit	19	0
Polymyosit	23	0

B E G R Ä N S N I N G A R

1. Även om närvaron av antikroppar mot mitokondrieantigen med hög titer antyder primär biliär cirros, måste dessa data ses mot bakgrunden av andra kliniska fynd och laboratorieresultat.
2. En del individer kan ha höga värden mitokondrieantikroppar med ringa eller inget belägg för klinisk sjukdom. Å andra sidan kan ett litet antal PBC-patienter ha ej detekterbara nivåer av dessa antikroppar.
3. Om omtestning av patient eller om efterföljande prover krävs, rekommenderas att samma typ av prov (serum eller plasma) används under hela uppföljningsperioden.

R E F E R E N S E R

1. Kaplan MM. *New England Journal of Medicine*, **316**, 9, 521-529, 1987.
2. Powell FC, Schroeter AL, Dickson ER. *Quarterly Journal of Medicine*, New Series 62, **237**, 75-82, 1987.
3. Kyriatsoulis A, Manns M, et al. *J Immun Methods*, **109**, 113-121, 1988.
4. McHugh NJ, James IE, et al. *Clin Exp Immunol*, **81**, 244-249, 1990.
5. Neuberger J, Lombard M, Galbraith R, *Gut Supplement*, S73-S78, 1991.
6. Berg PA, Homberg JC, et al. *Lancet*, October 10, 1981.
7. Manns M. *Journal of Hepatology Review*, **9**, 272-280, 1989.
8. Surh CD, Danner DJ, et al. *Hepatology*, **9**, 1, 63-68, 1989.
9. Gupta RC. *Clin Exp Immunol*, **59**, 604-612, 1985.
10. Linderborn-Fotinos J, Baum H, Berg PA. *Hepatology*, **5**, 5, 763-769, 1985.

S A M M A N F A T T N I N G A V F Ö R F A R A N D E T

1. Späd patientprov samt positiva och negativa kontroller 1:101.
2. Tillsätt 100 µL av referenskontroll i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller, samt patientprov till respektive brunnar på mikrotiterstripet.
3. Inkubera under 60±10 minuter vid 18-25° C.
4. Tvätta stripsen 3 gånger.
5. Tillsätt 100 µL IgG/IgM-konjugat till varje brunn.
6. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
7. Tvätta stripsen 3 gånger.
8. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
9. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
10. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn.
11. Avläs absorbansen vid 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	M2-coated wells and strip holder / Cupules enduites de M2 et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con M2 / M2-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di M2 e supporto per strip /M2-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probediluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-M2 Standards 1-5/ Etalons anti-M2 1-5 / Estandares Anti-M2 1-5 / Anti-M2 Standards 1-5 / Standard anti-M2 1-5 / Anti-M2-standarder
CONTROL REF	Anti-2 Reference Control/ Témoins de référence anti-M2 / Control de Referencia Anti-M2 / Anti-M2 Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-M2 / Anti-M2 referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

EURO DIAGNOSTICA AB
Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
E-mail: info@eurodiagnostica.com
www.eurodiagnostica.com