



ANTI-M2 – PROTILÁTKY (M2)



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

ANTI – MITOCHONDRIÁLNÍ PROTILÁTKY (M2)

ELISA
MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

PRINCIP METODY

Anti – M2 (mitochondriální M2 podtyp) protilátky ve vzorku se vážou na antigen navázaný na povrchu mikrotitračních destiček. V průběhu druhé inkubace se váže konjugát (křenovou peroxidázou značené imunoglobuliny proti lidskému IgG) s protilátkami navázanými na povrchu jamky. Nakonec se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H₂O₂ do každé jamky jako enzymový substrát. Vzniklá enzymatická barevná reakce je zastavena kyselinou. Žluté zbarvení reakce se měří při 450 nm a intenzita absorbance je úměrná koncentraci M2 protilátek ve vzorku¹.

Obsah a složení

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

Další varování a bezpečnostní opatření naleznete v bezpečnostním listu produktu (SDS).

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

SKLADOVÁNÍ

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

Známky zhoršení kvality:

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

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

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

Ostatní činidla jsou připravena k přímému použití.

DOPLŇUJÍCÍ VYBAVENÍ

- zvlhčovací komůrka
- promývací zařízení pro mikrotitrační destičky
- reader nebo fotometr s mikrokvyetou a filtrem 450±10 nm.

VZORKY

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

PRACOVNÍ POSTUP

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

VÝPOČET

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

Kvalitativní stanovení:

Vypočtete absorbanci Cut-off následovně:

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

Vypočtete absorbanční poměr:

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

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



ANTI-M2 – PROTILÁTKY (M2)



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

ANTI – MITOCHONDRIÁLNÍ PROTILÁTKY (M2)

ELISA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY

REFERENČNÍ HODNOTY

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

KONTROLA KVALITY

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

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

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

- Reprodukovatelnost (run to run):

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

- Detekční limit: 1,0 IU/ml
- Stanovení je specifické pro protilátky anti-M2, patřící do skupiny dehydrogenáz 2-oxokyselin (dříve α -ketokyselin). Nebyly pozorovány žádné zkřížené reakce s ostatními mitochondriálními autoantigeny
- Interference: Hemoglobin (<1000mg/dL, bilirubin do 40mg/dL, triglyceridy do 3000 mg/dL neinterferují. Některé druhy léků a dalších látek mohou interferovat².
- Rozsah měření: 1,0–200 IU/ml. Jestliže získáte vyšší hodnoty, zředte vzorek ředícím pufrům (B) a opakujte stanovení.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovení antimitochondriálních protilátek AMA má nezastupitelné místo v diagnostice primární biliární cirhózy (PBC). Protilátky jsou přítomné v séru přibližně u 90-95 % pacientů. Dosud bylo popsáno devět subtypů mitochondriálních protilátek, ale pouze čtyři souvisejí s PBC: M2, M4, M8 a M9. Je však dobře známo, že pouze protilátky anti-M2 jsou specifické pro PBC. Tyto protilátky lze detekovat roky, dokonce desetiletí, před nástupem klinických a histologických příznaků. Stanovení anti-M2 metodou ELISA se pro jeho vysokou senzitivitu a specifitu doporučuje pro diferenciální diagnostiku PBC^{3,4,5,6}.

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

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

POZNÁMKY

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

LITERATURA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Tanaka A, Miyakawa H, Luketic VA, Kaplan M, Storch WB, Gershwin ME. The diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies, especially in primary biliary cirrhosis. Cell Mol Biol 2002;48(3):295-299.
4. Berg PA, Klein R. Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies. Sem Liver Dis 1989; 9:103-116.
5. Baum H, Palmer C. The PBC specific antigen. Mol Aspects Med 1985; 8:201-234.
6. Fussey SPM, Guest JR, James OFW, Bassendine MF, Yeanman SJ. Identification and analysis of the major M2 autoantigens in primary biliary cirrhosis. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:8654-8658.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 15.4. 2025

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod, LOT certifikát a bezpečnostní listy jsou k dispozici na internetové adrese: <https://einfo.bio> a na: www.jktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR: JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha 5,
tel.: +420 257 220 760, paha@jktrading.cz
SK: JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31 Stupava,
tel.: + 421 264 774 591, jk-trading@jk-trading.sk

V případě mimořádných událostí:

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