



MITOCHONDRIAL ANTIBODY TEST SYSTEM

For *In Vitro* Diagnostic Use

AD MRK48 (Rat)	48 Tests	AD MRK96 (Rat)	96 Tests
AD MOK48 (Mouse)	48 Tests	AD MOK96 (Mouse)	96 Tests

Introduction:

Mitochondrial Antibody (MA) are circulating auto antibodies in chronic liver disease and are of clinical importance in the differentiation of chronic active hepatitis (CAH) from chronic persistent hepatitis (CPH), and is particularly useful in the diagnosis of primary biliary cirrhosis (PBC). Tests for the detection of mitochondrial antibodies (MA) are recommended as an alternative to surgical exploration, as the presence of high titer MA can provide confirmatory evidence in the diagnosis of PBC. Both CAH and PBC have many overlapping immunologic features and may represent a continuum of a single disease entity. MA titers in PBC do not appear to have any correlation with clinical activity, since they do not vary with the severity or progression of the disease, and cannot serve as a monitor of response to therapy or provide prognostic information.

MA are present in sera of patients with a variety of liver disorders but are only present in high titer in the majority of patients with PBC. Recent studies have demonstrated that MA titers greater than 1:40 are found only in patients with PBC.

The detection of MA by the indirect immunofluorescent technique is most useful in the differential diagnosis of extrahepatic obstruction in which only less than 2% of these patients possess this antibody and only at low titer (Table I). Rat or mouse kidney is utilized for MA detection in this test system.

**TABLE I
INCIDENCE OF MITOCHONDRIAL ANTIBODIES IN VARIOUS DISORDER**

Disease	Mitochondrial Antibodies
1. Primary Biliary Cirrhosis	greater than 90
2. Chronic Active Hepatitis (HBsAg-Negative)	greater than 50%
3. Chronic Active Hepatitis (HBsAg-Positive)	greater than 60%
4. Cryptogenic Cirrhosis	30 %
5. Alcoholic Cirrhosis	greater than 30%
6. Chronic Persistent Hepatitis	less than 20%
7. Hemochromatosis	greater than 50%
8. Cholangitis	23%
9. Hepatic Metastases	6%
10. Endocrine Disorders of Collagenoses	3-26%
11. Extra Hepatic Obstruction	less than 2%

Principles: The MA reaction involves circulating antibodies that bind to the inner lipoprotein membrane and cristae of mitochondria. These antibodies are not organ or tissue specific and may be found in many different tissues which are abundant in mitochondria. Mitochondrial rich cells line the proximal and distal tubules of the rat or mouse kidney which is used as the test substrate in indirect immunofluorescent procedures. MA are primarily of the IgG class but may also include IgA and IgM.

Since MA will react with kidney tubules, thyroid epithelial cells and stomach parietal cells, ALPHADIA offers two and three tissue sections per well to help differentiate organ specific antibodies. A rat kidney and monkey thyroid slide facilitates this type of immediate differentiation in one well.

The primary test reaction involves circulating mitochondrial antibodies present in the patient's serum which attach to their homologous mitochondrial antigens. This occurs during the incubation period while the serum covers the antigen surface. A secondary reaction then follows a rinsing period which removes the unbound human antibody. The reagent used in the secondary reaction is a fluorescein labelled antihuman globulin conjugate. The antigen surface is then thoroughly rinsed free of unbound conjugate and viewed under an appropriate fluorescent microscope.

Bright granular cytoplasmic fluorescence of the renal tubules indicates a positive result. Fluorescence of other cellular antigens such as nuclei, smooth muscle, connective tissue or a non-granular fluorescence limited to the central portion of the proximal tubules should not be reported as positive MA.

Materials Provided:

Storage & Stability of Components:

- FITC IgG Conjugate No. AD CGER2 (3.0 ml)/AD CGER5 (5.0 ml) with Evans Blue Counterstain is to be stored at 2-8°C upon receipt. The conjugate is stable at this temperature until expiration date on the vial label.
- The antigen slides of rat or mouse kidney sections must be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
- MA positive control No. AD PCMI (1.0 ml) should be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
- Universal negative control No. AD NC (1.0 ml) should be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
- Buffer Pack No. AD PBS1 - Phosphate Buffered Saline is stable at room temperature storage. Check label for specific expiration date. The reconstituted Buffer does not contain preservatives and should be stored at 2-8°C. Care should be taken to avoid contamination.
- Mounting Medium No. AD TMM3 is stable when stored at 2-8°C. Check label for specific expiration date.

Note: All kit components are available separately. Please see the current ALPHADIA Catalog for more details.

Additional Materials Required but not Provided:

- Test tubes and rack or microtiter system
- Disposable pipettes
- Staining Dish and Slide Forceps
- Moisture Chamber
- Volumetric Flask (500 ml)

Distilled H₂O
Fluorescence Microscope
Paper Towels . lint free

Preparation:

Buffer Pack No. AD PBS1. Rehydrate buffer with 1 liter of sterile distilled water.

Specimen Collection:

Serological specimens should be collected under aseptic conditions. Hemolysis is avoided through prompt separation of the serum from the clot. Serum should be stored at 2-8°C if it is to be analyzed within a few days. Serum may be held for 3 to 6 months by storage at -20°C or lower. Lipemic and strongly hemolytic serum should be avoided. When specimens are shipped at ambient temperatures, addition of a preservative such as 0.01% (thimerosal) or 0.095% sodium azide is strongly recommended.

Test Instruction:

Screening: dilute test serums 1:20 in PBS. **Titration:** set up doubling dilutions of serum starting at 1:20 (i.e.; 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, etc.)

- Once slides reach room temperature tear slide envelope at notch. Carefully remove the slide and avoid touching the antigen areas. The slide is now ready to use.
- Place a drop of diluted serum (20 to 30 µl) and controls over the antigen wells.
- Place slide with patient's serum and controls in a moist chamber for 30 minutes at room temperature (approximately 24°C).
- Remove slide from moisture chamber. Using a wash bottle, gently rinse remaining sera from slide being careful not to aim the rinse stream directly on to the well.
- Wash in PBS for five minutes. Repeat using fresh PBS.
- Place a blotter on the lab table with absorbent side up. Remove slide from PBS and invert so that tissue side faces absorbent side of blotter. Line up wells to blotter holes. Place slide on top of blotter. **Do not allow tissue to dry.** Wipe back of slide with dry lint free paper towel. Apply sufficient pressure to slide while wiping to absorb buffer.
- Deliver 1 drop (25-30 µl) of conjugate per antigen well. Repeat steps 3-6.
- Place 4-5 drops of mounting medium on slide.
- Apply a 22 x 70 mm coverslip. Examine the slide under a fluorescent microscope. Note: To maintain fluorescence, store mounted slide in a moisture chamber placed in a dark refrigerator.

Quality Control:

- Positive and negative serum controls must be included in each day's testing to confirm reproducibility, sensitivity and specificity of the test procedure. The negative serum control should result in little (+) or no fluorescence. If this control shows bright fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
- The positive serum control should result in bright 3+ to 4+ fluorescence. If this control shows little or no fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
- In addition to positive and negative serum controls, a PBS control should be run to establish that the conjugate is free from nonspecific staining of the antigen substrate. If the antigen shows bright fluorescence in the PBS control repeat using fresh conjugate. If the antigen still fluoresces, either the conjugate or antigen may be at fault.

Results:

Primary Biliary Cirrhosis (PBC) is a chronic intra hepatic cholestasis found more frequently in women than in men, with an incidence which is highest in the 30-60 age group. The diagnosis of PBC is based upon clinical observations, histologic findings on liver biopsy, increased alkaline phosphatase activity, elevated IgM levels, and presence of mitochondrial antibodies.

A positive result is observed as granular fluorescence in the cytoplasm of the renal tubules. The fluorescence is limited to the cytoplasm of the proximal and distal tubular epithelium. Fluorescence of other cellular antigens such as nuclei, smooth muscle, or non-granular fluorescence limited to the central (lumen) portion of the proximal tubules should not be reported as positive MA.

Titer Interpretation:

MA The titer is the highest dilution of patient's serum showing weak (1+) fluorescence of the renal tubular epithelium.

Less than 1:20
Normal, negative

1:20 - 1:80
Positive. Suggestive of liver disease. Repeat with a fresh specimen in two weeks.

1:160 or greater
Presumptive primary biliary cirrhosis.

The titer range in PBC is from 1:10 to 1:6,000 with about 50% of PBC patients having titers between 1:2000 to 1:6000. MA titers do not appear to change with time or therapy and cannot serve as monitors of response to therapy.


Limitations of Procedure:

- No diagnosis should be based upon a single serologic test result, since various host factors must be taken into consideration.
- Clinical manifestations, histologic finds on liver biopsies, elevation of IgM and increased alkaline phosphatase values should all be considered in the final diagnosis of PBC.
- Liver and kidney microsomal antibody stains proximal tubules preferentially whereas MA reacts with distal tubules more strongly than with proximal tubules.
- A normal serum IgM is strong evidence against the diagnosis of PBC as increased concentration of this immunoglobulin is the dominant abnormality in this disease.
- Anti-smooth muscle antibody can be detected in 30-50% and antinuclear antibody in 25-46% of patients with PBC.

Precautions:

- All human components have been tested by radioimmunoassay for (HB_sAg) and HTLVIII/LAV by an FDA approved method and found to be negative. (Not repeatedly reactive). However, this does not assure the absence of HB_sAg or HTLVIII/LAV. All human components should be handled with appropriate care.
- The sodium azide 0.095% included in the controls and conjugate is toxic if ingested.
- Do not use components beyond their expiration date.
- Follow the procedural instructions exactly as they appear in this insert to insure valid results.
- For in vitro diagnostic use.
- Handle slides by the edges since direct pressure on the antigen wells may damage the antigen.
- Once the procedure has started do not allow the antigen in the wells to dry out. This may result in false negative test results, or unnecessary artifacts.
- Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
- Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination. Do not reuse substrate slide.

US

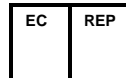
Component	AD CGER2, AD CGER5, AD CGER10, FITC (IFA) Conjugate with Evans Blue Counterstain	Precautionary Statement Prevention:
Pictogram		<ul style="list-style-type: none"> Avoid breathing mists, vapors and/or sprays. Use only outdoors or in a well-ventilated area. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection
Signal Word	WARNING	Response:
Hazard Statement	Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. May cause respiratory irritation	<ul style="list-style-type: none"> IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. Take off contaminated clothing and wash before reuse. Specific treatment, see supplemental first aid information. If skin irritation occurs, get medical advice/attention IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
		Storage/Disposal:
		<ul style="list-style-type: none"> Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. Store locked up. Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.

BIBLIOGRAPHY:

- Nacarato R, Chiamonte M, Borrelli A and Farini R: Circulating antibodies in chronic liver disease. Chron Hep Intl Symp, Montecatini. P Sentilini, H Popper and S Karger, Eds., p. 114-6 1976.
- Sherlock S and Schever PJ: The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis. N Engl J Med 289:647, 1973.
- Doniach D and Walker JG: Progress report: Mitochondrial antibodies (MA). Gut, 15:664-8, 1974.
- Galbraith RM, Smith M, Mackenzie RM, Dudley E, Doniach D and Williams R: High prevalence of sero-immunologic abnormalities in relatives of patients with active chronic hepatitis or primary biliary cirrhosis. New Engl J Med 290:63-9, 1974.
- Gupta RC, Dickson ER, McDuffie FC and Baggenstoss AH: Circulating IgG complexes in primary biliary cirrhosis. A serial study in forty patients followed for two years. Clin Exp Immunol 34:19-27, 1978.
- Ferguson A and MacSween RNM: Autoimmune disease of the liver. In: Immunological Aspects of the Liver and Gastrointestinal Tract, Chapter 10. University Park Press, Baltimore, p. 345-86 1976.
- Ben-Yoseph Y, Shapiro E and Doniach D: Further purification of the mitochondrial inner membrane autoantigen reacting with primary biliary cirrhosis sera. Immunology 26:311-21, 1974.
- Gerber MA and Thung SN: Ultrastructural localization of mitochondrial and ribosomal antigens by peroxidase labelled human antibodies. Labor invest 39:101, 1978.
- Ladefoged K, Andersen P and Jorgensen J: Autoantibodies and serum immunoglobulins in chronic liver diseases. Acta Med Scan 205:104-9, 1979.
- Rizzetto M, Swana G and Doniach D: Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. Clin Exp Immunol 15:331-44, 1973.
- Skredes S, Blomhoff JP and Gjone E: Biochemical features of acute and chronic hepatitis. Ann Clin Res 8:182-99, 1976.
- Ward AM, Ellis G and Goldberg D.M.: Serum immunoglobulin concentrations and autoantibody titers in diseases of the liver and biliary tree. Am Soc Clin Pathol 70:352-8, 1978.
- Husby G, Skredes S, Bloomhoff JP, Jacobsen CD, Berg K and Gjone E: Serum immunoglobulins and organ non-specific antibodies in disease of the liver. Scan J Gastroenterol 12:297-302, 1977.




ALPHADIA sa/nv
DIAGNOSTIC PRODUCTS
 Avenue Vésale 26
 B1300 WAVRE
 BELGIUM
 TEL : 32 (0) 10 24 26 49
 FAX : 32 (0) 10 24 55 99
 contact@alphadia.be




Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP The Hague
 The Netherlands



Component	AD PBS, 1 PBS Powder Packets AD TMM3 Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention:
Pictogram		<ul style="list-style-type: none"> Wash thoroughly after handling. Wear eye/face protection
Signal Word	WARNING	Response:
Hazard Statement	Causes serious eye irritation.	<ul style="list-style-type: none"> IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
		Storage/Disposal:
		<ul style="list-style-type: none"> Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.

EU

Component	AD PBS1 PBS Powder Packets AD TMM3 Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention:
Pictogram		P264 Wash thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves and clothing.
Signal Word	WARNING	Response:
Hazard Statement	H319 Causes serious eye irritation	P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing. P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.

Français



MITOCHONDRIAL ANTIBODY TEST SYSTEM

Réservé au diagnostic *in vitro*.

AD MRK48 (Rat)	48 Tests	AD MRK96 (Rat)	96 Tests
AD MOK48 (Souris)	48 Tests	AD MOK96 (Souris)	96 Tests

Intitulé du test:

Screening des anticorps anti-mitochondries par IFI

Application:

Le test d'immunofluorescence indirecte est destiné au screening des autoanticorps anti-mitochondries circulant dans le sérum de patients.

Principe:

La réaction principale du test implique des anticorps circulant dans le sérum du patient qui se lient à leurs antigènes homologues. Ceci se produit pendant la période d'incubation lorsque le sérum recouvre la surface de l'antigène. Une deuxième réaction suit alors une étape de rinçage qui élimine tous les anticorps humains non fixés. Le réactif utilisé lors de la seconde incubation est un conjugué anti-globuline humaine marquée à la fluorescéine. La lame est ensuite soigneusement rincée pour éliminer l'excès de conjugué non fixé, et est observée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Matériel fourni:

Conservation et stabilité des composants

1. Lames de coupe de rein de rat ou de souris, conserver entre 2 et 8°C
2. Contrôle positif anti mitochondries No AD PCMI, conserver entre 2 et 8°C
3. Contrôle négatif universel No AD NC, conserver entre 2 et 8°C.
4. Conjugué ITCF anti-IgG H&L avec bleu d'Evans conserver entre 2 et 8°C.
5. Sachet de tampon No AD PBS1 - Tampon phosphate salin. Le tampon reconstitué qui ne contient pas d'agents conservateurs doit être conservé à 2-8°C.
6. Le milieu de montage ITCF No AD TMM3 est stable lorsqu'il est conservé entre 2 et 8°C.

Matériel supplémentaire requis mais non fourni:

Tubes à essai et portoir ou plaques de microtitration
 Pipettes jetables.
 Bac de coloration et pinces pour lames
 Chambre humide
 Ballon volumétrique (500 ml)
 H2O distillée
 Microscope à fluorescence
 Serviettes en papier (non pelucheuses)

Préparation des réactifs:

1. Sachet de tampon No AD PBS1. Réhydrater le tampon avec 1 litre d'eau distillée stérile.

Prélèvement des échantillons:

Les échantillons de sang doivent être prélevés dans des conditions aseptisées. Une hémolyse est évitée par une séparation rapide du sérum du caillot. Le sérum doit être conservé à 2-8 °C en cas d'analyse prévue dans un délai de quelques jours. On peut garder le sérum pendant 3 à 6 mois en le conservant à une température maximale de -20°C. Éviter les sérums lipidiques et fortement hémolysés. Lorsque les échantillons sont expédiés à température ambiante, l'ajout d'un agent conservateur tel que 0,01 % (thimérosal) ou 0,095 % d'azide de sodium est fortement conseillé.

Instructions du test:

Test de screening: diluer les sérums à 1:20 dans du PBS

Titration: préparer des dilutions sérielles du sérum à partir de 1:20 (à savoir, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, etc.)

1. Une fois les lames revenues à température ambiante, ouvrir le sachet de lames en le déchirant à l'encoche. Retirer la lame avec soin et éviter de toucher les puits où se situent les antigènes. La lame est maintenant prête à l'emploi.
2. Déposer une goutte de sérum dilué (20 à 30 µl) et des contrôles dans les puits contenant les antigènes.
3. Placer la lame dans une chambre humide à température ambiante (environ 20-24°C) pendant 30 minutes.
4. Enlever la lame de la chambre humide. À l'aide d'une pissette, rincer délicatement les puits en prenant soin de détourner le jet de rinçage des puits.
5. Laver dans un bac de lavage avec du PBS pendant cinq minutes. Répéter l'opération en utilisant du PBS frais.
6. Placer un buvard sur la table du laboratoire avec le côté absorbant tourné vers le haut. Retirer la lame du PBS et la retourner de manière à placer le côté frottis en face du côté absorbant du papier buvard. Aligner les puits pour absorber le contenu des trous à l'aide du buvard. Placer la lame sur le buvard. Ne pas laisser sécher les tissus. Essuyer le dos de la lame avec une serviette en papier non pelucheuse. Ne pas exercer trop de pression sur la lame tout en l'essuyant pour absorber le tampon.
7. Déposer 1 goutte (20 à 30 µl) de conjugué dans chaque puits. Répéter les étapes 3 à 6.
8. Déposer 4 à 5 gouttes de liquide de montage sur la lame.
9. Déposer une lamelle couvre-objet de 22 x 70 mm. Examiner la lame sous un microscope à fluorescence.

Remarque: Pour maintenir la fluorescence, conserver la lame montée dans une chambre humide placée à l'obscurité dans un réfrigérateur.

Contrôle de qualité:

1. Des contrôles de sérum positif et négatif doivent être inclus dans chaque série pour confirmer la reproductibilité, la sensibilité et la spécificité du test.
2. Le contrôle de sérum négatif devrait faire apparaître peu (1+) ou pas de fluorescence. La mise en évidence d'une fluorescence vive par ce contrôle peut résulter du contrôle, de l'antigène, du conjugué ou de la technique.
3. Le contrôle de sérum positif doit montrer une fluorescence vive de 3+ à 4+. La mise en évidence d'une fluorescence faible ou inexistante par ce contrôle peut résulter du contrôle, de

l'antigène, du conjugué ou de la technique.

4. En plus des contrôles de sérums positifs et négatif, effectuer un contrôle PBS pour s'assurer que le conjugué ne provoque pas de coloration non spécifique du substrat antigénique. Si l'antigène montre une fluorescence vive avec le contrôle PBS, répéter l'opération à l'aide d'un nouveau conjugué. Une fluorescence de l'antigène peut être due à une dégradation du conjugué ou de l'antigène.

Interprétation des images:

Auto anticorps anti-mitochondries (MA) : La cirrhose biliaire primitive (CBP) est une maladie hépatique chronique se traduisant par une cholestase intra hépatique. On l'observe plus fréquemment chez la femme que chez l'homme avec une prédominance dans le groupe des 30-60 ans. Le diagnostic est établi sur base des données cliniques, des observations histologiques, de l'augmentation de la phosphatase alcaline, des IgM élevées et de la présence d'anticorps anti-mitochondries. Un résultat est positif lorsque la fluorescence cytoplasmique des tubules rénaux (proximaux et distaux) apparaît. Toute autre fluorescence ne peut être considérée comme étant un anti-mitochondrie.

Interprétation du titre:

< à 1 : 20: Normal, négatif

1 : 20 - 1 : 80: Positif. Suggère une atteinte hépatique. Répéter le test après 2 semaines.

1 : 160 ou plus: CBP probable.

Près de 50% des CBP ont des titres compris entre 1:2000 et 1:6000. Ces titres sont en général stables et ne sont pas modifiés par le traitement ou l'évolution de la maladie.

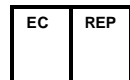
Précautions:

1. Le HBsAg et le HTLV-III/LAV ont été testés par dosage radio immunologique pour tous les composants d'origine humaine, par une méthode approuvée par la FDA, et se sont avérés négatifs. Ceci ne garantit toutefois pas l'absence de HBsAg ou de HTLV-III/LAV. Tous les composants d'origine humaine doivent être manipulés avec les précautions appropriées.
2. Les contrôles et le conjugué contiennent du sodium azide (0,095%).
3. Ne pas utiliser les composants après leur date de péremption.
4. Suivre les instructions de la méthode exactement comme elles figurent dans cette notice afin de garantir des résultats valables.
5. Réservez au diagnostic *in vitro*.
6. Manipuler les lames par les bords car une pression appliquée directement sur les puits contenant les antigènes peut altérer la structure de l'antigène.
7. Une fois la procédure lancée, ne pas laisser sécher les antigènes des puits. Ceci peut entraîner l'obtention de résultats faussement négatifs ou l'apparition d'artefacts superflus.
8. Utiliser des tips pour chaque échantillon et réactif pour éviter une contamination croisée.
9. Les réactifs doivent être inspectés pour preuve de contamination bactérienne ou contamination fongique.
10. Ne pas réutiliser les lames après usage.

Composants	AD PBS1 PBS sachet de poudre AD TMM3 Liquide de montage	Déclaration de précaution Prévention: P264 Se laver les mains soigneusement après manipulation. P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. Réponse: P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P337+P313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.
Pictogramme		
Mot de signal	ATTENTION	
Mention de danger	H319 Provoque une sévère irritation des yeux.	



ALPHADIA sa/nv
 DIAGNOSTIC PRODUCTS
 Avenue Vésale 26
 B1300 WAVRE
 BELGIUM
 TEL : 32 (0) 10 24 26 49
 FAX : 32 (0) 10 24 55 99
 contact@alphadia.be



Emergo Europe
 Prinsessegracht 20
 2514 AP The Hague
 The Netherlands



Deutsch



MITOCHONDRIAL ANTIBODY TEST SYSTEM

Die Tests sind für die *diagnostische Verwendung in vitro* bestimmt.

AD MRK48 (Ratte)	48 Tests	AD MRK96 (Ratte)	96 Tests
AD MOK48 (Maus)	48 Tests	AD MOK96 (Maus)	96 Tests

Testtitel:

IFT für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen mitochondriale (MA) Antigene in Patientenserum

Verwendungszweck:

Der indirekte Immunfluoreszenztest wird als Screeningtest für zirkulierende mitochondriale (MA) im Patientenserum empfohlen.

Prinzip:

Die primäre Testreaktion erfasst im Serum des Patienten zirkulierende Antikörper, die sich an ihre homologen Antigene anlagern. Dies findet in der Inkubationszeit statt, während das Serum die Antigenoberfläche bedeckt. Auf einen Auswaschvorgang, in dem alle ungebundenen humanen Antikörper entfernt werden, folgt eine sekundäre Reaktion. Das in der sekundären Reaktion verwendete Reagens ist ein fluoreszenzmarkiertes Antihumanoglobulin. Die Antigenoberfläche wird danach vollständig von ungebundenem Konjugat freigespült und unter einem geeigneten Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Bereitgestellte Materialien:

Lagerung und Stabilität von Komponenten:

1. Ratte oder Maus (Niere) (bei 2-8°C lagern)
2. MA Positivkontrolle Nr. AD PCMI
3. Universelle Negativkontrolle (bei 2-8°C lagern) Nr. AD NC
4. FITC IgG H&L Konjugat mit Evans-Blau (bei 2-8°C lagern) Nr. AD CGER2 (3 ml), AD CGER5 (5 ml)
5. Pufferpackung Nr. AD PBS1 . Phosphatgepufferte Salzlösung (rekonstituierter Puffer enthält keine Konservierungsmittel und sollte bei 2-8°C gelagert werden).
6. FITC Einbettungsmittel Nr. AD TMM3 lässt sich bei 2-8°C stabil lagern.

Weitere erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien:

- Reagenzgläser und Gestell- oder Mikrotitersystem
- Einmalgebrauchspipetten
- Färbeschale und Objektträgerpinzette
- Feuchtkammer
- Messkolben (500 ml)
- Destilliertes H2O
- Fluoreszenzmikroskop
- Nichtfasende Papiertücher

Reagensvorbereitung:

1. Pufferpackung Nr. AD PBS1. Puffer mit 1 Liter sterilem destilliertem Wasser rehydratisieren.

Probennahme:

Serologische Proben sollten unter aseptischen Bedingungen genommen werden. Hämolyse wird durch umgehende Trennung des Serums vom Koagulat vermieden. Serum sollte bei 2-8°C gelagert werden, wenn es innerhalb weniger Tage analysiert werden soll. Serum lässt sich bei -20°C oder darunter 3 bis 6 Monate lang lagern. Lipämisches und stark hämolytisches Serum sollte vermieden werden. Wenn Proben bei Raumtemperatur bereitgestellt werden, wird die Zugabe eines Konservierungsmittels wie 0,01% (Thimerosal) oder 0,095% Natriumazid sehr empfohlen.

Testanweisung:

Screening: Verdünnen Sie Testsera 1:20 in PBS.

Titrationen: Setzen Sie die Serumverdünnungen in jeweils zweier Verdünnungsstufen an, beginnend bei 1:20 (d. h. 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 usw.)

1. Wenn die Objektträger Raumtemperatur erreicht haben, reißen Sie die Objekttr. gerhülle an der Kerbe auf. Entnehmen Sie den Träger vorsichtig, ohne die Antigenbereiche zu berühren. Der Objektträger ist nun einsatzbereit.
2. Geben Sie jeweils einen Tropfen verdünntes Serum (20 bis 30 μ l) und Kontrolle auf die Antigenkavitäten.
3. Legen Sie den Objektträger mit dem Patientenserum und den Kontrollen 30 Minuten lang in eine Feuchtkammer bei Raumtemperatur (ungefähr 20-24°C).
4. Nehmen Sie den Objektträger aus der Feuchtkammer. Spülen Sie verbleibende Sera mit einer Waschflasche vom Objektträger, wobei Sie sorgfältig darauf achten, den Spülstrahl nicht direkt auf die Kavität zu richten.
5. Fünf Minuten in PBS waschen. Wiederholen Sie den Vorgang mit frischem PBS.
6. Legen Sie ein Löschblatt auf den Labortisch, mit der absorbierenden Seite nach oben. Nehmen Sie den Objektträger aus dem PBS und drehen Sie ihn um, so dass die Gewebeseite der absorbierenden Seite des Löschblatts zugewandt ist. Richten Sie die Kavitäten auf die Löschblattoberseite aus. Legen Sie den Objektträger auf die Löschblattoberseite. Das Gewebe darf nicht austrocknen. Wischen Sie die Tr.gerrückseite mit einem nichtfasernen Papiertuch ab. Üben Sie beim Abwischen zum Absorbieren des Puffers genügend Druck auf den Objektträger aus.
7. Geben Sie 1 Tropfen (20-30 μ l) Konjugat auf jede Antigenkavität. Wiederholen Sie die Schritte 3-6.
8. Geben Sie 4-5 Tropfen Einbettungsmittel auf den Objektträger.
9. Setzen Sie ein Deckglas von 22 x 70 mm auf. Untersuchen Sie den Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop. Hinweis: Um die Fluoreszenz aufrechtzuerhalten, lagern Sie den präparierten Objektträger in einer Feuchtkammer in einem dunklen Kühlschrank.

Qualitätskontrolle:

1. Positive und negative Serumkontrollen müssen täglich beim Testen einbezogen werden, um die Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit und Spezifität der Testprozedur zu bestätigen.
2. Die negative Serumkontrolle sollte zu geringer (+) oder ausbleibender Fluoreszenz führen.

Sollte sich bei dieser Kontrolle helle Fluoreszenz zeigen, ist die Kontrollprobe, das Antigen, das Konjugat oder die Vorgehensweise möglicherweise fehlerhaft.
3. Die positive Serumkontrolle sollte zu heller Fluoreszenz von 3+ bis 4+ führen. Sollte sich bei dieser Kontrolle geringe oder keine Fluoreszenz zeigen, ist die Kontrollprobe, das Antigen, das Konjugat oder die Vorgehensweise möglicherweise fehlerhaft
4. Zusätzlich zu positiven und negativen Serumkontrollen sollte eine PBS-Kontrolle durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass das Konjugat frei von unspezifischer Färbung des Antigensubstrats ist. Wenn das Antigen bei der PBS-Kontrolle Wenn das Antigen noch immer fluoresziert, ist das Konjugat oder das Antigen möglicherweise fehlerhaft.

Ergebnisse:

Die Primäre-biliäre Zirrhose (PBC) ist eine chronische intrahepatische Cholestase, die im Lebensabschnitt von 30-60 Jahren vermehrt bei Frauen als bei Männern beobachtet wird. Die Diagnose von PBC wird gestützt durch klinischen Beobachtungen, histologische Befunde der Leberbiopsie, durch vermehrte Alkalische Phosphataseaktivität, erhöhte IgM Titer und Vorhandensein von mitochondrialen Antikörpern. Als positiv wird eine granuläre Fluoreszenz des Zytoplasmas der Nierentubuli gewertet. Meist ist die Fluoreszenz auf das Zytoplasma der proximalen und distalen Tubuli Epithelien beschränkt. Eine Fluoreszenz anderer zellulärer Antigene wie Nukleolie, glatte Muskulatur, oder eine nicht-granuläre Fluoreszenz, die auf das Lumen der proximalen Tubulie beschränkt bleibt, sollte nicht als MA positiv gewertet werden.

Titer Beurteilung:

MA: Es wird die Titerstufe angegeben bei der die höchste Verdünnung des Patientenserums eine schwache Fluoreszenz (1+) des Epitheliums der Nierentubuli zeigt.

Kleiner als 1:20 Normal, negativ

1:20 - 1:80 Positiv, Verdacht auf eine Lebererkrankung. In zwei Wochen mit einem frischen Serum Test wiederholen.

1:160 oder größer Verdacht auf eine aktive Primär-biliäre Zirrhose.

Bei PBC können Titer von 1:10 bis 1:6000 vorkommen. 50% der PBC Patienten haben Titer von 1:2000 bis 1:6000. MA Titer verändern sich nicht im Zeitverlauf oder unter Therapie. Daher können sie nicht zur Therapiekontrolle herangezogen werden.

Vorkehrungen:

1. Alle humanen Bestandteile wurden mit Radioimmunttest auf (HBsAg) und HTLVIII/LAV mit einer FDA-anerkannten Methode negativ getestet. (Nicht wiederholt reaktiv.) Dies gewährleistet jedoch nicht die Abwesenheit von HBsAg oder HTLVIII/LAV. Alle humanen Bestandteile sollten mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.
2. Den Kontrollproben und dem Konjugat ist Natrium azide (0,095%) zugegeben.
3. Verwenden Sie keine Bestandteile über das Verfallsdatum hinaus.
4. Befolgen Sie die methodischen Anweisungen genau wie in dieser Beilage beschrieben, um gültige Ergebnisse zu gewährleisten.
5. Für diagnostische Verwendung in vitro.
6. Fassen Sie die Objektträger an den Kanten an, da direkter Druck auf die Antigenkavitäten das Antigen beschädigen kann.
7. Nach Beginn der Prozedur darf das Antigen in den Kavitäten nicht austrocknen. Dies kann zu falschen negativen Testergebnissen oder unnötigen Artefakten führen.
8. Verwenden Sie getrennte Pipette Tips für jede Probe und Reagenz zu treffen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
9. Reagenzien geprüft werden sollen auf Anzeichen von Bakterien- oder Pilzbefall.
10. Nicht wiederverwenden Objektträger.

Komponente	1601, 1608, 16010 PBS Powder Packets 1610 Mounting Medium	Sicherheitshinweis Prävention: P264 Nach Gebrauch ö gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Antwort: P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen.. Weiter spülen. P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Piktogramm		
Signalwort	ACHTUNG	
Gefahrenhinweis	H319 Verursacht schwere Augenreizung.	



ALPHADIA sa/nv
DIAGNOSTIC PRODUCTS
Avenue Vésale 26
B1300 WAVRE
BELGIUM
TEL : 32 (0) 10 24 26 49
FAX : 32 (0) 10 24 55 99
contact@alphadia.be



EC	REP
----	-----

Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands



italiano



MITOCHONDRIAL ANTIBODY TEST SYSTEM

Per uso diagnostico in vitro.

AD MRK48 (Ratto)	48 Tests	AD MRK96 (Ratto)	96 Tests
AD MOK48 (Topo)	48 Tests	AD MOK96 (Topo)	96 Tests

Titolo del test:

Test IFA per Anticorpi mitocondriali (MA)

Uso previsto:

Il test di immunofluorescenza indiretta è raccomandato come test di screening per gli anticorpi mitocondriali (MA) nel siero del paziente.

Principi:

La reazione primaria del test implica la circolazione nel siero del paziente di anticorpi che si legano ai loro antigeni omologhi. Ciò si verifica durante il periodo di incubazione, quando il siero ricopre la superficie dell'antigene. Successivamente ad un periodo di risciacquo necessario per la rimozione degli anticorpi umani non legati, avviene una reazione secondaria. Il reagente utilizzato nella reazione secondaria è un coniugato antiglobulina umana marcato con fluoresceina. La superficie dell'antigene viene quindi completamente risciacquata in modo da eliminare il coniugato non legato e quindi osservata con un idoneo microscopio a fluorescenza.

Materiali in dotazione:

Conservazione e stabilità dei componenti:

- Sezioni di ratto di topo (rene), conservare a una temperatura di 2-8°C.
- Controllo positivo MA n. AD PCMI conservare a una temperatura di 2-8°C.
- Controllo negativo universale n. AD NC conservare a una temperatura di 2-8°C.
- Coniugato FITC IgG H&L con Blu di Evans n. AD CGER2 (3 ml), AD CGER5 (5 ml) conservare a una temperatura di 2-8°C.
- Confezione tampone n. AD PBS1 - Tampone fosfato. Il tampone ricostituito non contiene conservanti e deve essere conservato a una temperatura di 2-8°C.
- La soluzione di montaggio FITC n. AD TMM3 rimane stabile se conservata a una temperatura di 2-8°C.

Materiali aggiuntivi richiesti ma non in dotazione:

Provette per test e cestello o sistema per microtitolazione
Pipette monouso
Vaschetta per colorazione e pinze per vetrini
Camera umida
Pallone volumetrico (500 ml)
Acqua distillata
Microscopio a fluorescenza
Carta assorbente che non lasci residui

Preparazione del reagente:

- Confezione tampone n. AD PBS1. Reidratare il tampone con 1 litro di acqua distillata sterile.

Raccolta dei campioni:

Raccogliere i campioni sierologici in condizioni asettiche. L'emolisi viene evitata separando tempestivamente il siero dal coagulo. Conservare il siero a una temperatura di 2-8°C se questo deve essere analizzato entro pochi giorni. È possibile conservare il siero per un periodo di 3-6 mesi a una temperatura pari o inferiore a -20°C. Evitare il siero lipemico e fortemente emolitico. Se i campioni vengono spediti a temperatura ambiente, si raccomanda l'aggiunta di un conservante come il timerosal 0,01% o sodio azide 0,095%.

Istruzioni per il test:

Screening: diluire i sieri da testare 1:20 in tampone fosfato.

Titolazioni: impostare diluizioni di siero al raddoppio a partire da 1:20 (cioè 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, ecc.)

- Quando i vetrini raggiungono la temperatura ambiente, strappare l'involucro in corrispondenza dell'apposita tacca. Rimuovere con cautela il vetrino dall'involucro evitando di toccare le aree su cui è presente l'antigene. Il vetrino è pronto per l'uso.
 - Versare una goccia di siero diluito (da 20 a 30 μ l) e i controlli sui pozzetti dell'antigene.
 - Posizionare il vetrino con il siero del paziente e i controlli in una camera umida a temperatura ambiente (circa 24°C) per 30 minuti.
 - Rimuovere il vetrino dalla camera umida. Risciacquare delicatamente il siero rimanente sul vetrino con spruzzetta per lavaggio facendo attenzione a non dirigere il getto direttamente sul pozzetto.
 - Lavare in tampone fosfato per cinque minuti. Ripetere la procedura utilizzando tampone fosfato fresco.
 - Posizionare un tampone di carta assorbente sul tavolo del laboratorio con il lato assorbente rivolto verso l'alto. Rimuovere il vetrino dal tampone fosfato e capovolgerlo in modo che il lato su cui è applicato il campione di tessuto sia a contatto con il lato assorbente del tampone. Allineare i pozzetti con i fori del tampone. Posizionare il vetrino sulla parte superiore del tampone. Non lasciare asciugare il tessuto. Pulire la parte posteriore del vetrino con carta assorbente asciutta che non lasci residui. Assorbire il tampone fosfato con la carta esercitando una leggera pressione ed accertarsi che il vetrino sia asciutto.
 - Versare 1 goccia (20-30 μ l) di coniugato in ciascun pozzetto di antigene. Ripetere le fasi da 3 a 6.
 - Versare 4-5 gocce di soluzione di montaggio sul vetrino.
 - Applicare un vetrino coprioggetto da 22 x 70 mm. Esaminare il vetrino al microscopio a fluorescenza.
- Nota: per mantenere la fluorescenza, conservare il vetrino montato in una camera umida all'interno di un refrigeratore al buio.

Controllo di qualità:

- Il controllo di siero positivo e negativo devono essere inclusi in tutti i test del giorno per confermare la riproducibilità, la sensibilità e la specificità della procedura.
- Il controllo di siero negativo deve visualizzare una fluorescenza minima (+) o nulla. Una eventuale fluorescenza evidente di questo controllo indica un problema a livello di controllo, di

antigene, di coniugato o di procedura tecnica.

3. Il controllo di siero positivo deve visualizzare una fluorescenza evidente da 3+ a 4+. Una eventuale fluorescenza minima o nulla di questo controllo indica un problema a livello di controllo, di antigene, di coniugato o di procedura tecnica.

4. In aggiunta ai controlli di siero positivi e negativi, eseguire un controllo con tampone fosfato per stabilire se il coniugato è libero da colorazioni non specifiche del substrato dell'antigene. Se l'antigene mostra una fluorescenza evidente nel controllo con tampone fosfato, ripetere la procedura utilizzando coniugato fresco. La presenza continua di fluorescenza indica un problema a livello del coniugato o dell'antigene stesso.

Interpretazione dei titoli:

Il titolo è la più alta diluizione del siero del paziente, che mostra fluorescenza debole (1+) dell'epitelio del tubulo renale.

Inferiore a 1:20 Normale, negativo

1:20 - 1:80 Positivo, Suggestivo di malattia epatica. Ripetere con un nuovo campione entro due settimane.

1:160 o maggiore Presuntivamente cirrosi biliari primaria.

La gamma dei titoli nei casi di CBP varia da 1:10 a 1:16000 con circa il 50% dei pazienti con CBP, che mostrano titoli compresi tra 1:2000 a 1:6000. I titoli nei casi di MA non mostrano di variare con il tempo o con la terapia e non possono essere utilizzati per monitorare la risposta terapeutica.

Precauzioni:

- Tutti i componenti umani sono stati testati mediante test radioimmunologico per (HBsAg) e HTLVIII/LAV con metodo approvato dalla FDA e sono risultati negativi (non reattivi ripetutamente). Tuttavia, questo non garantisce l'assenza di HBsAg o HTLVIII/LAV. Tutti i componenti umani devono essere manipolati con estrema cautela.
- Sodium Azide (0,095%) è compresa in controlli e coniugato.
- Non utilizzare componenti scaduti.
- Per garantire risultati validi, seguire le istruzioni procedurali esattamente come vengono descritte in questo inserto.
- Per uso diagnostico in vitro.
- Manipolare i vetrini prendendoli dai bordi in quanto la pressione diretta sui pozzetti dell'antigene può danneggiare l'antigene stesso.
- Dopo aver iniziato la procedura, non fare asciugare l'antigene nel pozzetto. Ciò può comportare risultati falsi negativi o artefatti inutili.
- Separate le punte della pipetta per ogni campione e dei reagenti per evitare la contaminazione incrociata.
- I reattivi devono essere controllati per la prova di contaminazione batterica o fungina.
- Non riutilizzare vetrini con substrate.

Componente	AD PBS1 PBS Confezione tampone AD TMM3 La soluzione di montaggio	Consiglio di prudenza Prevenzione: P264 Lavare accuratamente δ dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
Pittogramma		Risposta: P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
AVVERTENZA	ATTENZIONE	
Indicazione di Pericolo	H319 Provoca grave irritazione oculare.	



ALPHADIA sa/nv
DIAGNOSTIC PRODUCTS
Avenue Vésale 26
B1300 WAVRE
BELGIUM
TEL : 32 (0) 10 24 26 49
FAX : 32 (0) 10 24 55 99
contact@alphadia.be



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands



El español



MITOCHONDRIAL ANTIBODY TEST SYSTEM

Para uso diagnóstico in vitro.

AD MRK48 (Rata)	48 Tests	AD MRK96 (Rata)	96 Tests
AD MOK48 (Ratón)	48 Tests	AD MOK96 (Ratón)	96 Tests

Nombre de la prueba:

Ensayo de anticuerpos anti-mitocondriales IgG

Aplicación:

La prueba de inmunofluorescencia indirecta se recomienda como prueba de detección para autoanticuerpos circulantes anti mitocondriales (AMA) en suero del paciente.

Principio:

La principal reacción de la prueba consiste en la unión de anticuerpos circulantes del suero del paciente a sus antígenos homólogos. Esto sucede durante el período de incubación en el que el suero recubre la superficie de antígeno. Tras un período de lavado para eliminar los anticuerpos humanos que no se han unido se procede a una reacción secundaria. El reactivo utilizado en la reacción secundaria es un conjugado de anti-globulina humana marcados con fluoresceína. A continuación, la superficie de antígeno se aclara a fondo para eliminar el conjugado que no se ha unido y se examina en un microscopio de fluorescencia adecuado.

Materiales suministrados:

Almacenamiento y estabilidad de los componentes:

1. Rata o ratón (riñón), almacenar a 2-8°C
2. Control positivo AMA n.º AD PCMI, almacenar a 2-8°C
3. Control negativo universal n.º AD NC, almacenar a 2-8°C.
4. Conjugado IgG (H y L) de FITC con azul de Evans, n.º AD CGER2 (3 ml), AD CGER5 (5 ml), almacenar a 2-8°C.
5. Sobre de tampón n.º AD PBS1 - tampón fosfato salino. PBS, el tampón reconstituido no contiene conservantes y debe almacenarse a 2-8°C.
6. El medio de montaje FITC n.º AD TMM3 es estable cuando se almacena a 2-8°C.

Otros materiales necesarios pero no suministrados:

Tubos de ensayo y gradilla, o sistema de micro-titulación

Pipetas desechables

Placa de tinción y pinzas para portaobjetos

Cámara húmeda

Matraz volumétrico (500 ml)

Agua destilada

Microscopio de fluorescencia

Toallas de papel que no dejen pelusa

Preparación del reactivo:

1. Sobre de tampón n.º AD PBS1. Rehidratar el tampón con 1 litro de agua destilada estéril.

Toma de muestras:

Las muestras serológicas deben extraerse en condiciones asépticas. La hemólisis se evita separando rápidamente el suero del coágulo. Si se va a analizar en pocos días, el suero debe almacenarse a 2- 8 °C. Puede conservarse de 3 a 6 meses a una temperatura de -20°C o inferior. No conviene utilizar sueros lipémicos o fuertemente hemolíticos. Si las muestras se guardan a temperatura ambiente, es altamente recomendable añadir un conservante, como por ejemplo timerosal al 0,01% o azida sódica al 0,095%.

Instrucciones del ensayo:

Detección: diluya los sueros de prueba en proporción 1:20 en PBS.

Titulaciones: prepare diluciones de suero seriadas en proporción 2x a partir de 1:20 (es decir, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, etc.).

1. Una vez que el portaobjetos alcance la temperatura ambiente, rasgue el envoltorio tirando de la pestaña. Saque cuidadosamente el portaobjetos, evitando tocar las zonas de antígeno. El portaobjetos está listo para usar.
 2. Ponga una gota del suero diluido (de 20 a 30 l) y de los controles en los pocillos de antígeno.
 3. Coloque el portaobjetos con el suero del paciente y los controles en una cámara húmeda a temperatura ambiente (aproximadamente 20-24 °C) durante 30 minutos.
 4. Retire el portaobjetos de la cámara húmeda. Utilice un frasco lavador para aclarar suavemente los restos de suero del portaobjetos procurando no dirigir el chorro directamente hacia el pocillo.
 5. Lávelo en PBS durante cinco minutos. Repita la operación con PBS nuevo.
 6. Coloque un secante sobre la poyata de laboratorio con la cara absorbente hacia arriba. Retire el portaobjetos del PBS, dele la vuelta de modo que la cara de tejido quede orientada hacia la cara absorbente del secante. Alinee los pocillos con los orificios del secante. Coloque el portaobjetos sobre el secante. No deje que el tejido se seque. Seque el dorso del portaobjetos con una toalla de papel que no deje pelusa. Al secarlo, aplique al portaobjetos la presión necesaria para absorber el tampón.
 7. Ponga 1 gota (20-30 l) de conjugado en cada pocillo de antígeno. Repita los pasos 3 a 6.
 8. Ponga 4 ó 5 gotas de medio de montaje en el portaobjetos.
 9. Coloque un cubreobjetos de 22 x 70 mm. Examine el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia.
- Nota: para mantener la fluorescencia, guarde el portaobjetos montado en la nevera dentro una cámara húmeda y a oscuras.

Control de calidad:

1. Para confirmar la reproducibilidad, sensibilidad y especificidad del ensayo es necesario incluir controles de suero positivo y negativo en los análisis todos los días.
2. El resultado del control de suero negativo debe ser poca (+) o ninguna fluorescencia. Si este control muestra una fluorescencia brillante, el problema puede estar en el control, el antígeno, el conjugado o en la técnica.
3. El resultado del control de suero positivo debe ser una fluorescencia brillante del orden de 3+ a 4+. Si este control muestra poca o ninguna fluorescencia, el problema puede estar en el control, el antígeno, el conjugado o en la técnica.
4. Además de los controles de suero positivo y negativo, debe analizarse un control de PBS

AD MRK48 Printed in U.S.A Rev F 9/15/17

para confirmar que el conjugado no tiñe el sustrato de antígeno de manera inespecífica. Si el antígeno presenta una fluorescencia brillante en el control de PBS, repita el análisis usando conjugado nuevo. Si el antígeno sigue presentando fluorescencia, el problema puede estar en el conjugado o en el antígeno.

Interpretación de patrones:

MA: Cirrosis Biliar Primaria (PBC) es una colestasis intra hepática crónica que se encuentra más frecuentemente en la mujer que en el hombre con una incidencia mayor en el grupo de edades entre 30 y 60 años. El diagnóstico de la PBC está basada en observaciones clínicas, hallazgos histológicos en biopsias de hígado, por incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina, niveles de IgM elevados y presencia de anticuerpos mitocondriales. El resultado positivo se observa como una fluorescencia granular en el citoplasma de los túbulos renales. La fluorescencia está limitada al citoplasma del epitelio tubular distal y proximal. La fluorescencia de otros antígenos celulares así como el núcleo, músculo liso, ó fluorescencia no-granular limitada a la porción central (lumen) de los túbulos proximales no se informaran como MA positivos.

Interpretación del título:

El título es la dilución más alta del suero de paciente que presenta una débil (1+) fluorescencia del epitelio renal tubular.

Menos de 1:20 Normal, negativo

1:20 - 1:80 Positivo, Sugiere enfermedad hepática. Repetir con muestra fresca en dos semanas.

1:160 ó mayor Presumiblemente cirrosis biliar primaria.

El rango de títulos en PBC es desde 1:10 a 1:6000 con un 50% de los pacientes con PBC que presentan títulos de 1:2000 a 1:6000. Los títulos de MA no presentan cambios con el tiempo ó la terapia y no sirven para monitorizar la respuesta de la terapia.

Precauciones:

1. Todos los componentes humanos han sido probados mediante radioinmunoensayo para (HBsAg) y HTLVIII/LAV con un método aprobado por la FDA, y han dado resultados negativos (no repetidamente reactivos). No obstante, esto no garantiza la ausencia de HBsAg o HTLVIII/LAV. Todos los componentes humanos deben manipularse con las debidas precauciones.
2. Los controles y el conjugado contienen Sodium azide (0,095%).
3. No utilice ningún componente que haya sobrepasado la fecha de caducidad.
4. Para garantizar la validez de los resultados, siga las instrucciones del procedimiento exactamente como aparecen aquí.
5. Para uso diagnóstico in vitro.
6. Sujete los portaobjetos por los bordes, ya que la presión directa sobre los pocillos puede estropear el antígeno.
7. Una vez iniciado el procedimiento, no deje que el antígeno de los pocillos se seque. Esto podría dar falsos negativos o producir artefactos innecesarios.
8. Use distintas puntas de pipeta para cada una de las muestras y reactivos para evitar la contaminación cruzada.
9. Los reactivos deben inspeccionarse en busca de evidencias de contaminación bacteriana o micótica.
10. No reutilizar portaobjetos.

Componente	AD PBS1 PBS Sobre de tampón AD TMM3 El medio de montaje	Consejos de prudencia Prevención: P264 Lavarse ó concienzudamente tras la manipulación. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Respuesta: 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.
Pictograma		
Signal Word	ATENCIÓN	
Indicación de peligro	H319 Provoca irritación ocular grave.	











ALPHADIA sa/nv
DIAGNOSTIC PRODUCTS
Avenue Vésale 26
B1300 WAVRE
BELGIUM
TEL : 32 (0) 10 24 26 49
FAX : 32 (0) 10 24 55 99
contact@alphadia.be



EC	REP
----	-----

Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
REF	Catalog number Numero di catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge
EC REP	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter
	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung
	Number of tests Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste
	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsanweisung beachten
	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'expiration Halbbarkeitsdatum
	Store at 2-8 C / 35-46 F Conservare a 2-8°C/35-46 F Almacenar a 2-8°C / 35-46°F Conserver à 2-8°C Bei 2-8°C / 35-46°F lagern
	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung
	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Risque biologique potentiel Potentielle biologische Gefährdung
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig
IVD	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo in vitro Usage in vitro Für in-vitro diagnostische Verwendung
RUO	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke
IUO	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke
IFA/DFA PBS	Phosphate Buffered Saline Tampono salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate salin PBS Phosphatgepufferte Salzlösung
SOR	Sorbent Assorbent Sorbente Absorbant Sorbens

SLIDE	Tissue Substrate Slide Vetrini con substrate di tessuto Porto objetos de Sustrato de Tejido Lame portant le substrat tissulaire Gewebe-substrat-Objektträger
MM	Mounting Medium Mezzo di montaggio Medio de Montaje Liquide de montage Eindeckmedium
10x	Concentration Concentrazione Concentración Concentration Konzentration
ENS	Enhancement solution Soluzione di rinforzo Solución de realce Solution d'amplification Verstärkungslösung
WASHB	Wash Buffer Tampone di lavaggio Tampon de lavado Tampon de lavage Waschpuffer
MPS 12x8	Microplate Strips Strip per Micropietra Tiras de micro placa Microplaque Mikrotiterplattenstreifen
CONJ	Conjugate Coniugato Conjugado Conjugué Konjugat
SUB	Substrate Substrato Sustrato Substrat Substrat
STOP	Stop Solution Soluzione bloccante Solución de Parada Solution d'arrêt Stopplösung
CAL X	Calibrator(s) Calibratore (i) Calibrador (s) Calibrateur(s) Kalibrator(en)
CONTROL -	Negative Control Controllo Negativo Control Negativo Contrôle négatif Negative Kontrolle
CONTROL +	Positive Control Controllo Positivo Control Positivo Contrôle positif Positive Kontrolle
CONJ CNS	Counterstain Colorante di contrasto Contraste Contre colorant Gegenfärbung
CS	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläser
CONJ +	Positive Conjugate Coniugato Positivo Conjugado Positivo Conjugué Positif Positivekonjugat
CONJ -	Negative Conjugate Coniugato Negativo Conjugado Negativo Conjugué Négatif Negativkonjugat
DIL	Sample Diluent Diluente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung