



## Anti-Liver/Kidney Microsomal-1 (LKM1) Antibody ELISA

IVD

### PRODUCT INSERT

REF 1168 LKM1 ELISA 96 Determinations

#### INTENDED USE

An enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) for the detection and semi-quantitation of anti-liver/kidney microsomal-1 (LKM1) antibodies in human serum. The presence of LKM1 antibody can be used as an adjunct to clinical and other laboratory findings in the diagnosis of *autoimmune hepatitis*.

#### SUMMARY AND EXPLANATION

*Autoimmune hepatitis* (AIH) is a distinct chronic inflammatory liver disease, characterized by the attack of the immune system directed against "self" antigens, especially those expressed in the liver<sup>1,2</sup>. It occurs in both sexes and all age groups, however, women are more likely victims of AIH than men. In women, 70 % of diagnosed cases of AIH occur between the ages of 15 and 40.<sup>1-4</sup>

*Hepatomegaly* and *splenomegaly* are the most common pathological findings associated with AIH. Abnormalities of the immune system that mark AIH include autoantibodies to liver antigens, *hyper-gammaglobulinemia*, and an increased CD4/CD8 ratio in peripheral blood and liver. Liver-Kidney Microsomal (LKM1) antibodies can be induced not only by autoimmune mechanisms, but also by drugs such as *tienic acid*, *dihydralazine*, *halothane*, *phenytoin*, *phenobarbital*, *carbamazepine* and by Hepatitis C and D infections.<sup>4-6</sup>

The International Autoimmune Hepatitis Group categorizes AIH into two separate disease groups: Type 1 and Type 2. This distinction is based on the presence of marker autoantibodies in serum of affected patients.<sup>5</sup> AIH Type 1 is characterized by antinuclear autoantibodies (ANA's) and smooth-muscle antibodies (SMA's). Type 1 is the more common type of AIH, accounting for 60-70% of patients with AIH. Type 2 is a somewhat rarer disease (prevalance of AIH Type 2 is about 10 cases per million) characterized by the presence of autoantibodies against microsomal antigens of liver and kidney (LKM) and the absence of ANA and SMA<sup>3</sup>. 70% of these patients are young, from 2 to 14 years old at onset. The consequences of Type 2 AIH are severe: typically, acute onset progresses rapidly to cirrhosis and liver failure.

The autoantigen associated with LKM1 antibodies is cytochrome P4502D6. Antibodies to LKM1 occur predominantly in patients with AIH but can also be detected in some patients with HCV infection<sup>7-10</sup>. The Immco™ anti-LKM1 assay uses specific antigen to assure a high degree of specificity for AIH.<sup>7-10</sup>

\* manufactured under patent # 5,830,067

#### PRINCIPALS OF THE PROCEDURE

LKM1 antigen is bound to the wells of a polystyrene microwell plate followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and diluted patient sera are added to separate wells, allowing any LKM1 antibodies present to bind to the immobilized antigen. Unbound sample is washed away and an enzyme labeled anti-human IgG conjugate is added to each well. These enzyme conjugated antibodies bind specifically to the human immunoglobulin of the IgG class. After washing away any unbound conjugate, specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells. After stopping the enzymatic reaction, the intensity of color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in Enzyme Units per milliliter (EU/ml).

#### REAGENTS

##### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All

EN

reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. Coated microwell strips are for one time use only.

### Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>11</sup>. **WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

**Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.** Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

### Materials provided

Immulin™ LKM1 ELISA **REF** 1168









Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>LKM1</b>	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with LKM1 antigen.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A</b> <b>LKM1</b> *	Ready to use <b>Calibrator A</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B</b> <b>LKM1</b> *	Ready to use <b>Calibrator B</b> ( <i>violet cap</i> ). Human serum containing antibodies to LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C</b> <b>LKM1</b> *	Ready to use <b>Calibrator C</b> ( <i>blue cap</i> ). Human serum containing antibodies to LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D</b> <b>LKM1</b> *	Ready to use <b>Calibrator D</b> ( <i>yellow cap</i> ). Human serum containing antibodies to LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>LKM1</b> *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>white cap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . Contains pNPP. <b>Protect from light.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Powder <b>Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

EN

**Symbols used on labels:**

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

**Materials Required But Not Provided**

- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Deionized or distilled water
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Timer
- Absorbent paper
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

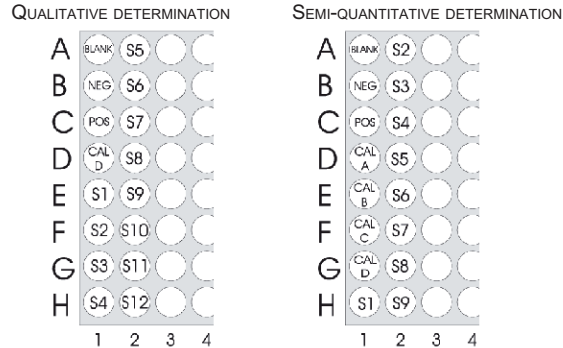
**PROCEDURE**

**Procedural Notes**

- Before starting the assay read these instructions carefully.
- Bring all reagents and samples to room temperature (20-26°C) for 30 minutes. Return materials to refrigerator immediately after use.
- Prepare all dilutions of the patient specimens before starting the test.
- **Immediately return unused strips to the pouch containing desiccants and seal securely to minimize exposure to water vapor.**
- Wash step: Good technique is critical. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- Careful timing is important. Incubation periods begin after dispensing reagents.

### Assay procedure

- ALL REAGENTS MUST BE BROUGHT TO ROOM TEMPERATURE (20-26°C) PRIOR TO BEGINNING THE ASSAY.**
- Label protocol record to indicate specimen placement in the microplate. It is good laboratory practice to test specimens in duplicate.
- Qualitative determination:** use only Calibrator D. **Semi-quantitative determination:** use Calibrators A - D as shown in the example below.



- Prepare a **1:101** dilution of the patient specimen by mixing **5 µl** of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
- Add **100 µl** of Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient specimens to the appropriate microwells indicated on the protocol record.  
**Note:** Include one well with **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Incubate **30 minutes** ( $\pm$  5 minutes) at room temperature on a level surface.
- Wash step: Thoroughly aspirate the contents of each well. Add 200-300µL of the **reconstituted** wash buffer to all wells then aspirate. Repeat this sequence thrice more for a total of four washes. Invert the plate and tap it on absorbent material to remove any residual fluid after the last wash. Do not dry wells completely.
- Add 100µL of the Conjugate to each well.
- Incubate the wells for 30 minutes.
- Wash step: Repeat step 7.
- Add 100µL of Enzyme Substrate to each well.
- Incubate for 30 minutes at room temperature.
- Add 100µL of Stop Solution to each well. Maintain the same sequence and timing of Stop Solution addition as was used for the Enzyme Substrate. Read the absorbance (OD) of each well at 405nm within one hour of stopping the reaction.
- Read the absorbance (OD) of each well at 405nm using a single or dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

### Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be  $<0.3$ . The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be  $<20$  EU/ml. If the test is run in duplicate, take the mean of the two readings to determine the EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

EN

## RESULTS

### Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

#### 1. QUALITATIVE DETERMINATION

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{EU/ml of Calibrator D} = \text{EU/ml Test Sample}$$

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in EU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

### Calibrator

The calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each test. Patient specimens containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

### Interpretation

The following information serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. Each laboratory must determine its own normal values.

#### **anti-LKM1 value Interpretation**

<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The results obtained serve only as an aid in the diagnosis of AIH type 2 and should not be interpreted as diagnostic in themselves. Serum of some AIH type 2 patients may be negative for anti-LKM1 antibodies

### EXPECTED VALUES

There is no single sensitive and specific marker for AIH. Diagnosis is made from a combination of clinical, biochemical, serological and histological features. The presence of a variety of autoantibodies helps in the identification and diagnosis of AIH. Based on the type of antibodies present, AIH can be divided into subtypes. Autoantibodies to LKM1 are specific indicators of type 2 AIH (see tables 1 and 2 at the end of this document).

### Precision

Two LKM1 positive sera were tested with the Immco™ LKM1 to determine inter- and intra-assay variability. See table 3 at the end of this document.

### Recovery:

Samples with known LKM1 concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts of LKM1. LKM1 levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. See table 4 at the end of this document.



## Μέθοδος ELISA για μικροσωματικά αντισώματα 1 ήπατος-νεφρού (LKM1)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1168 Μέθοδος ELISA για μικροσωματικά αντισώματα ήπατος-νεφρού (LKM1) 96 Προσδιορισμοί

### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ανίχνευση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των μικροσωματικών αντισωμάτων ήπατος/νεφρού (LKM1) σε ορό ανθρώπου. Η παρουσία του αντισώματος LKM1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επικουρικό μέσο των κλινικών και άλλων εργαστηριακών ευρημάτων, για τη διάγνωση της *αυτοάνοσης ηπατίτιδας*.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η *αυτοάνοση ηπατίτιδα* (AAH) είναι μια σαφής χρόνια φλεγμονώδης νόσος του ήπατος, η οποία χαρακτηρίζεται από επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον αντιγόνων του εαυτού, ιδιαιτέρως έναντι εκείνων που εκφράζονται στο ήπαρ<sup>1,2</sup>. Εμφανίζεται και στα δύο φύλα και σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, ωστόσο, οι γυναίκες είναι πιθανότερο να αναπτύξουν AAH σε σχέση με τους άντρες. Στις γυναίκες, το 70% των διαγνωσμένων περιστατικών AAH εμφανίζονται μεταξύ των ηλικιών 15 και 40.<sup>1-4</sup>

Η *ηπατομεγαλία* και η *σπληνομεγαλία* είναι τα συνηθέστερα παθολογικά ευρήματα που σχετίζονται με την AAH. Οι ανωμαλίες του ανοσοποιητικού συστήματος που είναι ενδεικτικές για AAH περιλαμβάνουν αυτοαντισώματα κατά αντιγόνων του ήπατος, *υπερ-γαμμασφαιριναιμία* και αυξημένο λόγο CD4/CD8 στο περιφερικό αίμα και στο ήπαρ. Τα μικροσωματικά αντισώματα ήπατος-νεφρού (LKM1) δεν επάγονται μόνο από αυτοάνοσους μηχανισμούς, αλλά επίσης και από φάρμακα όπως το *πιενικό οξύ*, η *διυδραλαζίνη*, το *αλοθάνιο*, η *φαινοτυΐνη*, η *φαινοβαρβιτάλη* και η *καρβαμαζεπίνη*, καθώς και από λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C και D.<sup>4,6</sup>

Η Διεθνής Ομάδα για την Αυτοάνοση Ηπατίτιδα κατηγοριοποιεί την AAH σε δύο ξεχωριστές νοσολογικές ομάδες: τύπου 1 και τύπου 2. Η διάκριση αυτή βασίζεται στην παρουσία αυτοαντισωμάτων δεικτών στον ορό των προσβεβλημένων ασθενών.<sup>5</sup> Η AAH τύπου 1 χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αντιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων

(ANA) και αντισωμάτων κατά των λείων μυϊκών ινών (SMA). Ο τύπος 1 είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος AAH, και αντιστοιχεί σε ποσοστό 60-70% των ασθενών με AAH. Ο τύπος 2 είναι μια σχετικά σπανιότερη νόσος (ο επιπολασμός της AAH τύπου 2 είναι περίπου 10 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο) που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των μικροσωματικών αντιγόνων του ήπατος και του νεφρού (LKM) και την απουσία αντισωμάτων ANA και SMA<sup>3</sup>.

Το 70% των ασθενών αυτών είναι νέοι, ηλικίας 2 έως 14 ετών κατά την εκδήλωση της νόσου. Οι επιπτώσεις της AAH τύπου 2 είναι σοβαρές: Συνήθως, η οξεία έναρξη εξελίσσεται ταχέως σε κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια. Το αυτοαντιγόνο που σχετίζεται με τα αντισώματα LKM1 είναι το κυτόχρωμα P4502D6. Τα αντισώματα κατά του LKM1 εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς με AAH αλλά μπορούν επίσης να ανιχνευθούν και σε κάποιους ασθενείς με λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV)<sup>7-10</sup>. Η ανάλυση αντι-LKM1 Immco™ χρησιμοποιεί ειδικό αντιγόνο προκειμένου να διασφαλίσει υψηλό βαθμό ειδικότητα για την AAH.<sup>7-10</sup>

\* κατασκευάζεται σύμφωνα με το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας υπ.αρ. 5.830.067

### ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Το αντιγόνο LKM1 δεσμεύεται στις κυψελίδες ενός πλακιδίου μικροκυψελίδων από πολυστυρένιο και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται, ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι αραιωμένοι οροί των ασθενών προστίθενται σε ξεχωριστές κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των LKM1 αντισωμάτων στο καθλωμένο αντιγόνο. Το δείγμα που δε δεσμεύτηκε εκπλένεται και προστίθεται σε κάθε κυψελίδα ένα σημασμένο με ένζυμο, συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG. Αυτά τα συζευγμένα με ένζυμο αντισώματα δεσμεύονται ειδικά στην ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη τάξης IgG. Αφού εκπλυθούν τα τυχόν μη δεσμευμένα συζευκτικά αντισώματα, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP). Μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης, η ένταση της αλλαγής του

EL

χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, μετράται με ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ενζύμου ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.** Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

### ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>11</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

**Για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ.** Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc.

Να χρησιμοποιείτε τις ορθές εργαστηριακές τεχνικές προκειμένου να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μικροβιακής και χημικής μόλυνσης. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

### Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για μικροσωμιακά αντισώματα ήπατος-νεφρού (LKM1) ImmuLisa™ REF 1168

Κάθε κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MICROPLATE</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LKM1</span>	<b>Πλακίδιο</b> ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο LKM1.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LKM1</span> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής Α</b> (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του LKM1.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">B</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LKM1</span> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής Β</b> (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του LKM1.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">C</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LKM1</span> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής C</b> (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του LKM1.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CALIBRATOR</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">D</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LKM1</span> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής D</b> (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του LKM1.
1 x 1,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">+</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LKM1</span> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα θετικού ελέγχου</b> (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για LKM1.

EL

1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση</b> . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>αραιωτικό διάλυμα ορού</b> . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>ενζυμικό υπόστρωμα</b> . Περιέχει ρ-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). <b>Να προστατεύεται από το φως</b> .
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα τερματισμού</b> .
2 x	<b>BUF WASH</b>	Σκόνη <b>ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης</b> . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

\* Περιέχει < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

**LOT** Αριθμός παρτίδας

**REF** Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

**IVD** In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

#### ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Συσσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικό χαρτί
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της

ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε προσεκτικά αυτές τις οδηγίες.
- Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-26°C) επί 30 λεπτά. Επιστρέψτε τα υλικά στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Προετοιμάστε όλες τις αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- **Επιστρέψτε αμέσως τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη θήκη με τα αποξηραντικά και σφραγίστε την ασφαλώς, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση σε υδρατμούς.**
- Στάδιο έκπλυσης: είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Η προσεκτική τήρηση των χρόνων είναι σημαντική. Οι περίοδοι επώασης ξεκινούν μετά τη χορήγηση των αντιδραστηρίων.

### Διαδικασία της μεθόδου

1. **ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΤΑΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (20-26°C) ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.**
2. Σημάνετε το αρχείο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πλακίδιο. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
3. **Ποιοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε μόνο το Βαθμονομητή D. **Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός:** χρησιμοποιήστε τους Βαθμονομητές A – D, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ		ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	
A	BLANK S5	A	BLANK S2
B	NEG S6	B	NEG S3
C	POS S7	C	POS S4
D	CAL D S8	D	CAL A S5
E	S1 S9	E	CAL B S6
F	S2 S10	F	CAL C S7
G	S3 S11	G	CAL D S8
H	S4 S12	H	S1 S9
	1 2 3 4		1 2 3 4

4. Προετοιμάστε μια αραιώση του δείγματος ασθενούς σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **0,5 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
5. Προσθέστε **100 μl** βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενούς στις κατάλληλες μικροκυψελίδες που υποδεικνύονται στο αρχείο του πρωτοκόλλου. **Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριο. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριο.
6. Επώαστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε μια επίπεδη επιφάνεια.
7. Στάδιο έκπλυσης: Αναρροφήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας. Προσθέστε 200-300μL του **αναασυσταθέντος** ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και έπειτα αναρροφήστε το. Επαναλάβετε αυτή την

EL

ακολουθία ενεργειών άλλες τρεις φορές, ώστε να πραγματοποιήσετε ένα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων. Αναστρέψτε το πλακίδιο και κτυπήστε το ελαφρά επάνω σε ένα απορροφητικό υλικό ώστε να απομακρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο υγρό από την τελευταία έκπλυση. Μην αποξηραίνετε πλήρως τις κυψελίδες.

8. Προσθέστε 100 μL συζευκτικού αντισώματος σε κάθε κυψελίδα.
9. Επώαστε τις κυψελίδες επί 30 λεπτά.
10. Στάδιο έκπλυσης: Επαναλάβετε το στάδιο 7.
11. Προσθέστε 100 μL ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα.
12. Επώαστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθέστε 100 μL διαλύματος τερματισμού σε κάθε κυψελίδα. Διατηρήστε την ίδια σειρά και τους ίδιους χρόνους στην προσθήκη διαλύματος τερματισμού, όπως και στην προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, εντός μιας ώρας από τον τερματισμό της αντίδρασης.
14. Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος 405 nm, χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριο, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι <0,3. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

#### 1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

**Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος**

\_\_\_\_\_ X EU/ml του βαθμονομητή D = EU/ml εξεταζόμενου δείγματος

**Απ/ση του Βαθμονομητή D**

#### 2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε EU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.

### Βαθμονομητής

Οι βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για να εξυπηρετήσουν τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή A. Για τον ακριβή προσδιορισμό

EL

των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν επί το συντελεστή αραιώσης.

### Ερμηνεία

Οι παρακάτω πληροφορίες παρέχονται μόνον ως οδηγός για την ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

Τιμή αντι-LKM1	Ερμηνεία
<20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (Οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται υποβοηθούν μόνο τη διάγνωση της ΑΑΗ και δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται από μόνα τους ως διαγνωστικά. Ο ορός αρκετών ασθενών με ΑΑΗ τύπου 2 ενδέχεται να είναι αρνητικός για αντι-LKM1 αντισώματα.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Δεν υπάρχει μοναδικός ευαίσθητος και ειδικός δείκτης για την ΑΑΗ. Η διάγνωση βασίζεται στο συνδυασμό των κλινικών, βιοχημικών, ορολογικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών. Η παρουσία διαφόρων αυτοαντισωμάτων βοηθά στην αναγνώριση και τη διάγνωση της ΑΑΗ. Με βάση τον τύπο των παρόντων αυτοαντισωμάτων, η ΑΑΗ μπορεί να διαιρεθεί σε υποτύπους. Τα αυτοαντισώματα κατά του LKM1 είναι ειδικοί δείκτες της ΑΑΗ τύπου 2 (βλ. πίνακες 1 και 2 στο τέλος αυτού του εντύπου).

### Ακρίβεια

Δύο οροί θετικοί στα αντισώματα κατά του LKM1 αναλύθηκαν με το kit LKM1 Immco™ προκειμένου να προσδιοριστεί ο συντελεστής ποικιλότητας εντός σειράς και μεταξύ σειρών. Βλ. τον πίνακα 3 στο τέλος αυτού του εντύπου.

### Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων LKM1 αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων LKM1. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα LKM1 των αναμιχθέντων δειγμάτων και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Βλ. τον πίνακα 4 στο τέλος αυτού του εντύπου.

ES



## Ensayo ELISA para anticuerpos anti microsomaes 1 de hígado y riñón (LKM1)

IVD

### PROSPECTO

REF 1168 ELISA LKM1 96 análisis

#### USO PREVISTO

Ensayo inmunenzimático (ELISA) para detección y semi cuantificación de anticuerpos anti microsomaes-1 de hígado y riñón (LKM1) en suero humano. La presencia de anticuerpos LKM1 es una ayuda en el diagnóstico de la *hepatitis autoinmune*, junto con los exámenes clínicos y otros análisis de laboratorio.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

LA *HEPATITIS AUTOIMMUNE* (HAI) es una enfermedad hepática inflamatoria diferenciada, en la que el sistema inmunitario ataca los auto antígenos, especialmente los que se manifiestan en el hígado<sup>1, 2</sup>. La enfermedad es común a ambos sexos y a todas las edades, aunque las mujeres son más propensas que los hombres a contraer HAI. En las mujeres, el 70% de los casos de HAI diagnosticada se producen entre los 15 y los 40 años.<sup>1-4</sup>

La *hepatomegalia* y la *esplenomegalia* son los hallazgos patológicos más comunes asociados a HAI. Entre las anomalías del sistema inmunitario que marcan la HAI están los anticuerpos contra los antígenos hepáticos, la *hipergamaglobulinemia* y un aumento del cociente de linfocitos CD4/CD8 en sangre periférica y en el hígado. Los anticuerpos anti microsomaes de hígado y riñón (LKM1) pueden ser inducidos no sólo por mecanismos autoinmunes sino también por fármacos como ácido tiónico, dihidralazina, halotano, fenitoína, fenobarbital, carbamazepina y por infecciones de hepatitis C y D.<sup>4-6</sup>

El Grupo Internacional de Hepatitis Autoinmune clasifica la HAI en dos grupos separados: tipo 1 y tipo 2. La distinción se basa en la presencia de autoanticuerpos marcadores en el suero de los pacientes afectados.<sup>5</sup> La HAI de tipo 1 se caracteriza por autoanticuerpos antinucleares (ANA) y anti músculo liso (SMA); es el tipo más común de HAI: pertenecen a este tipo el 60-70% de los pacientes con HAI. El tipo 2 es una patología bastante rara (la prevalencia de la HAI de tipo 2 es alrededor de 10 casos en un millón), caracterizada por la presencia de autoanticuerpos contra los antígenos microsomaes de hígado y riñón (LKM) y la ausencia de ANA y SMA<sup>3</sup>. El 70% de estos pacientes son jóvenes y tienen entre 2 y 14 años en el momento en que se manifiesta la dolencia. Las consecuencias de la HAI de tipo 2 son graves: normalmente, un comienzo agudo que progresa rápidamente hacia la cirrosis hepática e insuficiencia hepática.

El autoantígeno asociado a los anticuerpos LKM1 es el citocromo P4502D6. Los anticuerpos anti LKM1 están presentes sobre todo en pacientes con HAI, pero pueden detectarse también en algunos pacientes con infección por VHC<sup>7-10</sup>. El ensayo anti LKM1 Immco<sup>TM</sup> utiliza un antígeno específico para garantizar un alto grado de especificidad para HAI.<sup>7-10</sup>

\* fabricado bajo patente nº 5.830.067

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El antígeno LKM1 se une a los pocillos de una placa de poliestireno; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Controles, calibradores y muestra diluida de suero del paciente se añaden a pocillos separados, permitiendo que los anticuerpos anti LKM1 presentes se unan al antígeno inmovilizado. Las muestras no unidas se eliminan mediante lavado; a cada pocillo se añade un conjugado de IgG anti humana marcado con enzima. Este conjugado se une específicamente a la inmunoglobulina humana de clase IgG. El conjugado no unido se elimina mediante lavado y a continuación se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP). Se detiene la reacción enzimática y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración del anticuerpo, mediante un espectrofotómetro 405 nm. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por mililitro (EU/ml).

## REACTIVOS

### Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.**

No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C).

Las tiras de micropocillos revestidos deben usarse una sola vez. Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

### Precauciones

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales<sup>11</sup>. **ADVERTENCIA:** la azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

### Material suministrado

ELISA para anti LKM1 ImmuLisa™ **REF** 1168

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>LKM1</b>	<b>Microplaca</b> con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>A</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador A</b> listo para usar ( <i>tapa verde</i> ). Suero humano con anticuerpos anti LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>B</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador B</b> listo para usar ( <i>tapa morada</i> ). Suero humano con anticuerpos anti LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>C</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador C</b> listo para usar ( <i>tapa azul</i> ). Suero humano con anticuerpos anti LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>D</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador D</b> listo para usar ( <i>tapa amarilla</i> ). Suero humano con anticuerpos anti LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>LKM1</b> *	<b>Control positivo</b> listo para usar ( <i>tapa verde</i> ). Contiene suero humano positivo a LKM1.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	<b>Control negativo</b> listo para usar ( <i>tapa blanca</i> ). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina</b> listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de suero</b> listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.

ES

1 x 12 ml

**STOP**

**Solución Stop lista para usar.**

2 x

**BUF WASH**

**Tampón de lavado en polvo.** Reconstituir cada unidad hasta un litro.

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

#### **Símbolos utilizados en las etiquetas:**

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

**IVD** Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

#### **Materiales necesarios no suministrados**

- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

#### **RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS**

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

#### **PROCEDIMIENTO**

##### **Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos. Después de usarlos, vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y las muestras.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- **Guarde inmediatamente en el sobre con sustancias desecantes las tiras que no utilice; ciérrelo herméticamente para reducir al mínimo la exposición al vapor de agua.**

ES

- Fase de lavado: la buena técnica es crucial. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.

### Procedimiento del ensayo

1. **LOS REACTIVOS DEBEN ESTAR A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) ANTES DE DAR COMIENZO AL ENSAYO.**
2. Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
3. **Determinación cualitativa:** use sólo el calibrador D. **Determinación semi cuantitativa:**

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

A	BLANK	S5		
B	NEG	S6		
C	POS	S7		
D	CAL D	S8		
E	S1	S9		
F	S2	S10		
G	S3	S11		
H	S4	S12		
	1	2	3	4

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

A	BLANK	S2		
B	NEG	S3		
C	POS	S4		
D	CAL A	S5		
E	CAL B	S6		
F	CAL C	S7		
G	CAL D	S8		
H	S1	S9		
	1	2	3	4

4. Prepare una dilución de **1:101** de la muestra del paciente mezclando **5 µl** de la muestra con **0.5 ml** de diluyente de suero.
5. Añada **100 µl** de calibradores, control positivo y negativo y muestras diluidas del paciente a los pocillos indicados en la hoja de protocolo.  
**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.
6. Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente sobre una superficie plana.
7. Lavado: aspire completamente el contenido de cada pocillo. Añada 200-300µl de tampón de lavado reconstituido a todos los pocillos y aspire. Repita tres veces hasta completar cuatro lavados. Invierta la placa sobre papel absorbente y sacúdala para eliminar todo resto de líquido después del lavado. No seque del todo los pocillos.
8. Añada 100µl de conjugado a cada pocillo.
9. Incube los pocillos durante **30 minutos** ( $\pm 5$  min).
10. Lavado: proceda como en el punto 7.
11. Añada 100µl de substrato enzimático a cada pocillo.
12. Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
13. Añada 100µl de solución Stop a cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió la solución stop y el substrato enzimático. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405nm en el plazo de una hora después de haber detenido la reacción.
14. Lea la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 nm mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

### Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3. La lectura de absorbancia del calibrador no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de ambas lecturas para determinar las EU/ml. Cuando se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del Calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

### RESULTADOS

#### Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente pueden determinarse por uno de los siguientes métodos::

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

##### Abs. de muestra analizada

$$\text{Abs. de muestra analizada} \times \text{EU/ml de calibrador D} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

##### Abs. de calibrador D

#### 2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.

#### Calibrador

Los calibradores proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

#### Interpretación

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valor anti-LKM1	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (valores límite)
>25 EU/ml	Positivo

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados de este ensayo son sólo una ayuda en el diagnóstico de la hepatitis autoinmune de tipo 2 y no constituyen un diagnóstico por sí solos. El suero de algunos pacientes con HAI de tipo 2 podría ser negativo a anticuerpos anti LKM1

### VALORES ESPERADOS

No existe un marcador único sensible y específico de HAI. El diagnóstico se formula a través de una combinación de exámenes clínicos, bioquímicos, serológicos e histológicos. La presencia de una variedad de anticuerpos ayuda a identificar y diagnosticar la hepatitis autoinmune. Según el tipo de anticuerpos presentes, la hepatitis autoinmune puede clasificarse en dos subtipos. Los autoanticuerpos anti LKM1 son indicadores específicos de la HAI de tipo 2 (véanse las tablas 1 y 2 al final de este documento).

ES

**Precisión**

Se analizaron dos sueros positivos a LKM1 con el sistema LKM1 Immco™ con la finalidad de establecer la variabilidad inter ensayo e intra ensayo. Véase la tabla 3 al final de este documento.

**Recuperación:**

Se mezclaron muestras con concentraciones conocidas de LKM1 con las diluciones adecuadas de otra muestra positiva con cantidad conocida de LKM1. Se determinaron los niveles de LKM1 de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Véase la tabla 4 al final de este documento.



## Anti-Leber-Nieren-Mikrosomen-1-Antikörper-ELISA (LKM1)

IVD

### BEIPACKTEXT

REF 1168 LKM1 ELISA 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Anti-Leber-Nieren-Mikrosomen-1-Antikörpern (LKM1) in Humanserum. Das Vorhandensein von LKM1-Antikörpern kann als zusätzlicher Faktor neben klinischen Befunden und anderen Laborergebnissen bei der Diagnose von *autoimmuner Hepatitis* dienen.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

*Autoimmune Hepatitis* (AIH) ist eine eigenständige chronische entzündliche Lebererkrankung, die durch einen Angriff des Immunsystems auf körpereigene Antigene, insbesondere in der Leber exprimierte, gekennzeichnet ist<sup>1,2</sup>. Sie tritt bei beiden Geschlechtern und in allen Altersgruppen auf; Frauen sind jedoch häufiger von AIH betroffen als Männer. Bei Frauen treten 70% der diagnostizierten Fälle von AIH im Alter zwischen 15 und 40 Jahren auf<sup>1-4</sup>.

*Hepatomegalie* und *Splenomegalie* sind die am häufigsten mit AIH assoziierten pathologischen Befunde. Zu den Störungen des Immunsystems, die AIH kennzeichnen, zählen Autoantikörper gegen Leberantigene, *Hypergammaglobulinämie* und ein erhöhtes CD4/CD8-Verhältnis im peripheren Blut und in der Leber. Leber-Nieren-Mikrosomen-Antikörper (LKM1) können nicht nur durch Autoimmunmechanismen induziert werden, sondern auch durch Arzneimittel, z.B. *Tienylsäure*, *Dihydralazin*, *Halothan*, *Phenytol*, *Phenobarbital* und *Carbamazepin*, und durch Hepatitis-C und -D-Infektionen<sup>4,6</sup>.

Die International Autoimmune Hepatitis Group teilt AIH in zwei separate Krankheitsgruppen ein: Typ 1 und Typ 2. Diese Unterscheidung wird auf der Grundlage des Vorhandenseins von Markerautoantikörpern im Serum der betroffenen Patienten getroffen<sup>5</sup>. AIH vom Typ 1 wird durch antinukleäre Antikörper (ANA) und Antikörper gegen glatte Muskulatur (SMA) gekennzeichnet. Typ 1 ist die häufiger vorkommende Form von AIH und betrifft 60-70% der AIH-Patienten. Typ 2 ist eine etwas seltenere Krankheit (die Verbreitung von Typ-2-AIH liegt bei etwa 10 Fällen pro Millionen), die durch das Vorliegen von Autoantikörpern gegen mikrosomale Antigene der Leber und der Nieren (LKM) und die Abwesenheit von ANA und SMA gekennzeichnet ist<sup>3</sup>. 70% dieser Patienten sind beim Ausbruch der Krankheit jung, zwischen 2 und 14 Jahre alt. Typ-2-AIH hat schwere Folgen: ein akuter Ausbruch führt gewöhnlich rapid zu Zirrhose und Leberversagen.

Das mit den LKM1-Antikörpern assoziierte Autoantigen ist Zytochrom P4502D6. Antikörper gegen LKM1 treten hauptsächlich bei Patienten mit AIH auf, können aber auch bei einigen Patienten mit HCV-Infektionen nachgewiesen werden<sup>7-10</sup>. Der Immco Anti-LKM1-Test verwendet ein spezifisches Antigen, um ein hohes Maß an Spezifität für AIH sicherzustellen<sup>7-10</sup>.

\* hergestellt unter Patent # 5,830,067

### TESTPRINZIP

LKM1-Antigen wird an die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol gebunden. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in separate Vertiefungen gegeben; dies ermöglicht die Bindung der eventuell vorhandenen LKM1-Antikörper an das immobilisierte Antigen. Ungebundene Proben werden durch Waschen entfernt, und jeder Vertiefung wird ein enzymmarkiertes Anti-human-IgG-Konjugat hinzugefügt. Diese enzymkonjugierten Antikörper binden sich spezifisch an das humane Immunglobulin der Klasse IgG. Nachdem eventuell nicht gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt wurde, wird den Vertiefungen ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) hinzugefügt. Nachdem die enzymatische Reaktion gestoppt wurde, wird die Intensität der

DE

Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Enzymeinheiten pro Milliliter (EU/ml) angegeben.

## REAGENZIEN

### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.** Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Die beschichteten Mikrotiterstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

### Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>11</sup>.

WARNUNG – Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer.

Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten.

Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

### Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ LKM1-ELISA **REF** 1168

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.



12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>LKM1</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit LKM1-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>A</b> <b>LKM1</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator A</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>B</b> <b>LKM1</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator B</b> ( <i>lila Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>C</b> <b>LKM1</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator C</b> ( <i>blaue Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>D</b> <b>LKM1</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator D</b> ( <i>gelbe Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>LKM1</b> *	Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält LKM1-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.

DE

1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Gebrauchsfertige <b>Stopplösung</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Waschpuffer in Pulverform</b> . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

\* Enthält <0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

<b>LOT</b>	Chargennummer
<b>REF</b>	Bestellnummer
	Verwendbar bis
	Lagerungstemperatur
	Gebrauchsanleitung lesen
<b>IVD</b>	In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller
	Anzahl an Tests

#### Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

#### PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

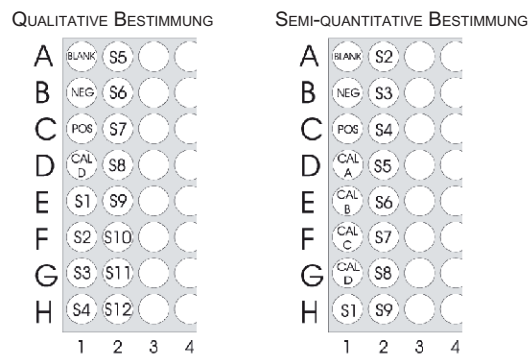
## VERFAHREN

### Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig diese Anweisungen, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Bringen Sie alle Reagenzien und Proben 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (20-26 °C). Stellen Sie die Materialien sofort nach ihrer Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Bereiten Sie alle Verdünnungen der Patientenproben vor Beginn des Tests vor.
- **Geben Sie nicht verwendete Streifen sofort wieder in den Beutel mit dem Trockenmittel und verschließen Sie diesen fest, um den Kontakt mit Wasserdampf so gering wie möglich zu halten.**
- Waschschrift: Eine gute Methode ist unerlässlich. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Eine sorgfältige zeitliche Koordinierung ist wichtig. Die Inkubationszeiträume beginnen nach der Verteilung der Reagenzien.

### Testverfahren

1. **ALLE REAGENZIEN MÜSSEN VOR BEGINN DES TESTS AUF RAUMTEMPERATUR (20-26 °C) GEBRACHT WERDEN.**
2. Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in der Mikrotiterplatte zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.
3. **Qualitative Bestimmung:** Verwenden Sie nur Kalibrator D. **Semi-quantitative Bestimmung:** Verwenden Sie Kalibratoren A-D wie im unten stehenden Beispiel gezeigt.



4. Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** der Patientenprobe mit **0,5 ml** Probenverdünner vermischen.
5. Geben Sie **100 µl** der Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.  
**Anmerkung:** Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.
6. Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 Minuten) lang bei Raumtemperatur auf einer ebenen Oberfläche.
7. Waschschrift: Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung gründlich aus. Geben Sie 200-300 µL des **rekonstituierten** Waschpuffers in alle Vertiefungen und saugen Sie ihn anschließend ab. Wiederholen Sie diese Schritte noch dreimal, bis Sie insgesamt viermal gewaschen haben. Drehen Sie die Platte um und klopfen Sie sie über saugfähigem Material ab, um jegliche nach dem letzten Waschen verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Trocknen Sie die Vertiefungen nicht vollständig.

DE

8. Geben Sie 100 µL Konjugat in jede Vertiefung.
9. Inkubieren Sie die Vertiefungen 30 Minuten lang.
10. Waschschrift: Wiederholen Sie Schritt 7.
11. Geben Sie 100 µL Enzymsubstrat in jede Vertiefung.
12. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
13. Geben Sie 100 µL Stopplösung in jede Vertiefung. Bewahren Sie bei der Zugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Geschwindigkeit bei, die Sie für das Enzymsubstrat verwendet haben. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung innerhalb einer Stunde nach Zufügen der Stopplösung bei 405 nm ab.
14. Lesen Sie die Extinktion (OD) jeder Vertiefung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenreader mit einer oder zwei Wellenlängen gegen die auf Null-Extinktion eingestellte Blindprobe ab.

### **Qualitätskontrolle**

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte <0,3 sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, verwenden Sie den Mittelwert der beiden Messungen, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

### **ERGEBNISSE**

#### **Berechnungen**

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

#### **1. QUALITATIVE BESTIMMUNG**

**Ext. der Testprobe**

\_\_\_\_\_ X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml der Testprobe

**Ext. von Kalibrator D**

#### **2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG**

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.

#### **Kalibrator**

Die Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie die erhaltenen Einheiten mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

#### **Interpretation**

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

DE

<b>Anti-LKM1-Wert</b>	<b>Interpretation</b>
< 20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
> 25 EU/ml	positiv

### **EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS**

Die erhaltenen Ergebnisse dienen nur als Hilfsmittel bei der Diagnose von AIH und sollten nicht allein als diagnostisch gedeutet werden. Das Serum einiger Typ-2-AIH-Patienten kann beim Test auf Anti-LKM1-Antikörper ein negatives Ergebnis zeigen.

### **ERWARTETE WERTE**

Es gibt keinen einzelnen sensitiven und spezifischen Marker für AIH. Die Diagnose wird aufgrund einer Kombination von klinischen, biochemischen, serologischen und histologischen Faktoren gestellt. Das Vorliegen verschiedener Autoantikörper hilft bei der Identifikation und Diagnose von AIH. Je nach der vorliegenden Antikörperart kann AIH in Untergruppen aufgeteilt werden. Autoantikörper gegen LKM1 sind spezifische Indikatoren für Typ-2-AIH (siehe Tabellen 1 und 2 am Ende dieses Dokuments).

### **Genauigkeit**

Zwei LKM1-positive Seren wurden mit dem Immco LKM1 getestet, um die interserielle und intraserielle Variabilität zu bestimmen. Siehe Tabelle 3 am Ende dieses Dokuments.

### **Wiederfindung:**

Proben mit bekannten LKM1-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit einer bekannten Menge an LKM1 gemischt. Die LKM1-Spiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Siehe Tabelle 4 am Ende dieses Dokuments.



## Test ELISA de détection des Anticorps Anti-Microsomiaux Foie/Rein (LKM1)

IVD

### ENCART DU PRODUIT

REF 1168 LKM1 ELISA 96 Tests

Immco™ LKM1 est un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la semi-quantification des anticorps anti-microsomiaux-1 foie-rein (LKM1) dans le sérum humain. La présence de ces anticorps constitue une aide précieuse pour le diagnostic de *l'hépatite auto-immunitaire*.

### GENERALITES

*L'hépatite auto-immunitaire (AIH)*, est une inflammation chronique du foie bien distincte, caractérisée par l'attaque du système immunitaire contre ses propres antigènes, spécialement ceux se trouvant dans le foie<sup>1,2</sup>. Cette maladie se retrouve chez les deux sexes et dans tous les groupes d'âge, bien que les femmes en soient plus souvent victimes que les hommes. Chez les femmes, 70% des cas d'AIH sont diagnostiqués entre 15 et 40 ans<sup>1-4</sup>.

*L'hépatomégalie* et la *splénomégalie* sont les relevés pathologiques les plus courants associés à l'AIH. Les anomalies du système immunitaire qui traduisent l'AIH incluent les autoanticorps des antigènes du foie, l'hypergammaglobulinémie, et un rapport CD4/CD8 augmenté dans la circulation périphérique et le foie. Les anticorps microsomiaux foie-rein (LKM1) peuvent être produits non seulement par des mécanismes auto-immunitaires mais aussi par des drogues telles que *l'acide tiénique, la dihydralazine, l'halothane, la phénytoïne, le phénobarbital, la carbamazépine* et par les infections des hépatites C et D<sup>4-6</sup>.

L'International Autoimmune Hepatitis Group catégorise l'AIH en deux groupes distincts : Type 1 et Type 2. Cette distinction est basée sur la présence de autoanticorps marqueurs dans le sérum des patients affectés<sup>5</sup>. L'AIH de Type 1 est caractérisée par la présence d'autoanticorps anti-nucléaires (ANA) et d'anticorps anti-muscle lisse (SMA). Le Type 1 est le type d'AIH le plus courant, il représente 60 à 70% des patients souffrant d'AIH. Le Type 2 est un peu plus rare (la prévalence du type 2 est d'environ 10 cas sur 1 million) et caractérisé par la présence d'autoanticorps contre les antigènes microsomiaux du foie et du rein (LKM) et l'absence d'ANA et de SMA<sup>3</sup>. 70% de ces patients sont jeunes, ils ont de 2 à 14 ans lors du développement de la maladie. Les conséquences de l'AIH de type 2 sont sévères : typiquement, un développement aigu évolue rapidement en cirrhose et destruction du foie.

L'autoantigène associé aux anticorps LKM1 est le cytochrome P4502D6. Les anticorps au LKM1 se retrouvent principalement chez des patients souffrant d'AIH mais peuvent également être détectés chez certains patients souffrant d'infection HCV<sup>7-10</sup>. Le kit Immco™ anti-LKM1 utilise un antigène spécifique pour assurer une spécificité élevée pour l'AIH<sup>7-10</sup>.

*\*fabriqué sous brevet n°5 830 067*

### PRINCIPES DU TEST

L'antigène LKM1 recombinant est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène et, ensuite, les sites n'ayant pas réagi sont bloqués pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de patients dilués sont ajoutés dans différents puits, autorisant chaque anticorps LKM1 présent à se lier à l'antigène en place. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti- IgG humaines est alors ajouté dans chaque puit pour révéler les anticorps du patient. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat enzymatique (pNPP) suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Après avoir arrêté la production enzymatique de produit coloré, la présence ou l'absence d'anticorps LKM1 sera déterminée par lecture au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en unités enzyme par millilitres (EU/ml).

## INFORMATION PRODUIT

### Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.** Ne pas employer le réactif si il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à la température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser. Le tampon de lavage est stable jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes. Reconstituer le tampon de lavage en y ajoutant de l'eau distillée ou déionisée pour un volume de 1 L. Les micropuits ne peuvent être utilisés qu'une seule fois.

### Précautions

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>11</sup>.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

**La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice.** Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas employer après la date d'échéance.

### Matériel fourni

ImmuLisa™ LKM1 ELISA [REF] 1168

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour exécuter 96 tests chacun.









12 x 8	MICROPLATE LKM1	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène LKM1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A LKM1 *	Etalon A (couverture verte), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B LKM1 *	Etalon B (couverture violette), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C LKM1 *	Etalon C (couverture bleue), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D LKM1 *	Etalon D (couverture jaune), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	CONTROL + LKM1 *	Contrôle positif (couverture rouge), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif pour LKM1.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif (couverture blanche), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.

FR

1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines.</b> Prêt à l'emploi. Code couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant pour sérum</b> prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat enzymatique</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Protéger de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampon de lavage</b> en poudre. Reconstituer pour 1 litre/ flacon.

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>

#### Symboles utilisés sur les étiquettes:

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

#### Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes (ex : 12 X 75 mm) et porte-tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Timer
- Papier absorbant
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

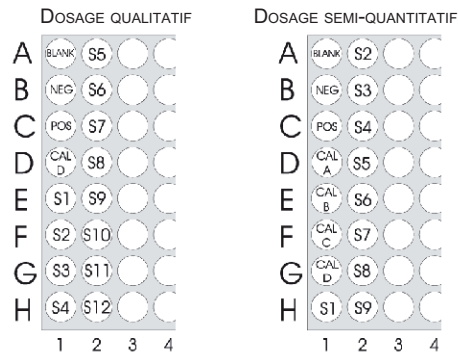
## METHODE

### Préparation du test

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante pendant 30 minutes (20-26°C) avant de les utiliser. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- **Remettre immédiatement les micro-lamelles non utilisées dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité.**
- Lavage: il est important d'utiliser une bonne technique. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.

### Exécution du test

1. **Porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20-26°C) avant de commencer le test.**
2. Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
3. **Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D. **Détermination semi-quantitative** : employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



4. Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
5. Ajouter **100 µl** des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits indiqués sur la feuille de protocole.  
**Note** : Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle.
6. Laisser incuber pendant **30 minutes** (+- 5 minutes) à température ambiante.
7. Lavage: aspirer soigneusement le contenu de chaque puit. Ajouter 200 à 300µl de tampon **reconstitué** dans tous les puits et aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne pas sécher complètement les puits.
8. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puit.
9. Laisser incuber pendant 30 minutes.

FR

10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
11. Ajouter 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puit.
12. Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
13. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique (D.O.) dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
14. Lire la densité optique (D.O.) de chaque puit à 405nm en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double en prenant le blanco de réactif comme référence de D.O. nulle.

### **Contrôle qualité**

Les étalons, les contrôles positifs et négatifs et un blanco doivent être présents dans chaque série de test pour garantir l'intégrité et la précision de ce dernier. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon A doit avoir une lecture de densité optique supérieure à 1.0, sinon le test doit être répété. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est réalisé en double, prendre la moyenne des deux lectures pour déterminer les concentrations en anticorps anti-hu tTG. Lors des déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour les déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs dans les fourchettes figurant sur le flacon. Nous recommandons de tester les échantillons à la limite de péremption avec des échantillons frais prélevés plus tard pour assurer la précision.

## **RESULTATS**

### **Calcul des résultats**

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes

#### **1. DETERMINATION QUALITATIVE**

**D.O. Echantillon**

----- X EU/ml étalon D = EU/ml Echantillon

**D.O. Etalon D**

#### **2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE**

Tracer l'absorbance des étalons A à D par rapport leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en EU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche. Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance.

### **Etalons**

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les retester jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en EU / ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

### **Interprétation**

L'information suivante sert seulement de guide dans l'interprétation des résultats de laboratoire. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

FR

<b>Valeurs anti-LKM1</b>	<b>Interprétation</b>
<20 EU/ml	Négatif (-)
20 – 25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif (+)

#### **LIMITES D'UTILISATION**

Les résultats obtenus servent seulement d'aide dans le diagnostic de l'AIH de type 2 et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic à part entière. Le sérum de quelques patients AIH Type 2 pourrait être négatif à la recherche des anticorps anti-LKM1.

#### **VALEURS PREVUES**

Il n'y a pas de marqueur AIH unique et spécifique. Le diagnostic est réalisé en interprétant les relevés cliniques, biochimiques, sérologiques et histologiques. La présence d'une variété d'anticorps est une aide pour l'identification et le diagnostic de l'AIH. En fonction du type d'anticorps présent, l'AIH peut être subdivisée en sous-types. Les autoanticorps LKM1 sont des indicateurs spécifiques de l'AIH de type 2 (voir tableaux 1 et 2 à la fin de ce document).

#### **Précision :**

Deux sérums positifs aux LKM1 ont été testés avec le kit Immco™ LKM1 pour déterminer la variabilité inter et intra-test. Voir tableau 3 à la fin de ce document.

#### **Récupération**

Des échantillons avec des concentrations connues de LKM1 ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues de LKM1. Les niveaux d'anticorps LKM1 des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir de ces valeurs le pourcentage de récupération calculé. Voir tableau 4 à la fin de ce document.



## Anticorpi Anti-microsomiali-1 Fegato/Rene (LKM1) ELISA

IVD

### INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1168 LKM1 ELISA 96 Determinazioni

#### FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione e la semiquantificazione di anticorpi anti-microsomiali-1 fegato/rene (LKM1) nel siero umano. La presenza di anticorpi anti-LKM1 può essere usata in congiunzione alle evidenze cliniche e ai risultati di altre analisi di laboratorio per la diagnosi dell'epatite autoimmune.

#### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'epatite autoimmune (AIH) è una distinta patologia infiammatoria epatica cronica caratterizzata dall'attacco da parte del sistema immunitario diretto contro gli autoantigeni, particolarmente quelli espressi nel fegato<sup>1,2</sup>. Si manifesta in entrambi i sessi e in tutti i gruppi di età, anche se le donne sono vittime più probabili rispetto agli uomini. Nelle donne, il 70% dei casi di AIH diagnosticati si presentano nella fascia di età dai 15 ai 40 anni<sup>1-4</sup>.

L'epatomegalia e la splenomegalia sono le più comuni manifestazioni patologiche associate con l'AIH. Le anomalie del sistema immunitario che indicano la presenza di AIH includono l'occorrenza di autoanticorpi agli antigeni epatici, ipergammaglobulinemia, e un aumento nel rapporto CD4/CD8 nel sangue periferico e nel fegato. Gli anticorpi anti-microsomiali di fegato/rene (LKM1) possono essere indotti non solo da meccanismi autoimmuni, ma anche da farmaci quali l'acido tienico, la diidralazina, l'alotano, la fenitoina, il fenobarbital, la carbamazepina e da infezioni derivanti da epatite C e D.

Il Gruppo Internazionale dell'Epatite Autoimmune classifica l'AIH in due gruppi separati e distinti: Tipo 1 e Tipo 2. Questa distinzione si basa sulla tipologia degli autoanticorpi marcatori che compaiono nel siero dei pazienti affetti<sup>5</sup>. L'AIH Tipo 1 è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi anti-nucleari (ANA) e di anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA). Il Tipo 1 è la forma più comune di AIH riscontrabile nel 60-70% dei pazienti con AIH. Il Tipo 2 è in un certo qual modo una patologia più rara (la prevalenza dell'AIH Tipo 2 è di circa 10 casi in un milione), caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi contro gli antigeni anti-microsomiali di fegato e reni (LKM) e dall'assenza di ANA e ASMA<sup>3</sup>. Il 70% di questi pazienti sono giovani di età compresa tra i 2 e i 14 anni all'esordio. Le conseguenze dell'AIH Tipo 2 sono gravi: tipicamente, l'esordio acuto progredisce rapidamente verso la cirrosi e la compromissione epatica. L'autoantigene associato agli anticorpi anti-LKM1 è il citocromo P4502D6. Gli anticorpi anti-LKM1 compaiono prevalentemente in pazienti con AIH, ma possono anche essere individuati in alcuni pazienti con infezione da HCV<sup>7-10</sup>. Il test anti-LKM1 Immco™ utilizza un antigene specifico per assicurare un grado elevato di specificità per l'AIH<sup>7-10</sup>.

\*prodotto con brevetto # 5,830,067

#### PRINCIPIO DELLE METODICA

L'antigene LKM1 si lega ai pozzetti presenti su una micropietra in polistirene; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratori e campioni diluiti di siero del paziente vengono aggiunti in pozzetti separati, e ciò permette agli anticorpi anti-LKM1 presenti nel siero di legarsi all'antigene immobilizzato. Il campione non legato viene lavato via e in ciascun pozzetto viene aggiunto un coniugato anti-IgG umana marcato con enzima. Questi anticorpi coniugati con l'enzima si legano in modo specifico all'immunoglobulina umana di classe IgG. Successivamente alla rimozione mediante lavaggio del coniugato non legato, nei pozzetti viene aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP). La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in unità di enzima per millilitro (EU/ml).

**REAGENTI****CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE**

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.** Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

**Precauzioni**

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>11</sup>. **ATTENZIONE** – L'azide sodica (NaN<sub>3</sub>) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

**Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo.** Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Usare tecniche di laboratorio idonee per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.



**Materiali forniti**

LKM1 ELISA ImmuLisa™ REF 1168

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni

<b>12 x 8</b>	<b>MICROPLATE</b> <b>LKM1</b>	<b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene LKM1.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR A</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibratore A</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-LKM1.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR B</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibratore B</b> (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-LKM1.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR C</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibratore C</b> (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-LKM1.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CALIBRATOR D</b> <b>LKM1</b> *	<b>Calibratore D</b> (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-LKM1.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CONTROL +</b> <b>LKM1</b> *	<b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per LKM1.
<b>1 x 1.5 ml</b>	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
<b>1 x 12 ml</b>	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umano pronto all'uso;</b> di colore rosa.
<b>1 x 60 ml</b>	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente siero</b> pronto all'uso; di colore blu.
<b>1 x 12 ml</b>	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato Enzimatico pronto all'uso.</b> Contiene pNPP. <b>Proteggere dalla luce.</b>
<b>1 x 12 ml</b>	<b>STOP</b>	<b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso.
<b>2 x</b>	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

\* Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>

**Simboli usati sulle etichette:** Numero di lotto Numero catalogo Scadenza Temperatura di conservazione Leggere le istruzioni per l'uso Uso diagnostico in vitro Produttore Numero di test**Materiali necessari ma non forniti**

- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Timer
- Carta assorbente
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

**RACCOLTA DEL CAMPIONE**

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

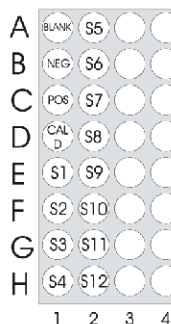
**PROCEDURA****Note sul test**

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti (20-26°C) per 30 minuti. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i materiali non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Riporre immediatamente le strisce inutilizzate nella busta di confezionamento dove sono presenti dissecanti e sigillare per minimizzare l'esposizione a vapore acqueo.**
- Fase di lavaggio: Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta dei reagenti.

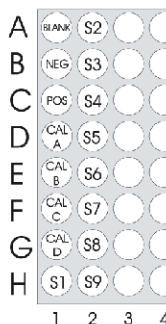
**Metodo del test**

- TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DELL'INIZIO DEL TEST.**
- Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nella micropiastra. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Determinazione qualitativa:** usare solo il Low Calibrator D. **Determinazione semi-quantitativa:** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso, come illustrato nell'esempio di disposizione riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA



DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA



- Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **0,5 ml** di Diluente del Siero.
- Aggiungere **100 µl di Calibratori, di Controlli Positivi e Negativi e di campioni del paziente diluiti nei pozzetti appropriati come indicato sul foglio protocollo.**  
**Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente su una superficie piana.
- Fase di lavaggio: Aspirare completamente i contenuti di ciascun pozzetto. Aggiungere 200-300µL del tampone di lavaggio **ricostituito** in tutti i pozzetti e poi aspirare. Ripetere questa sequenza per altre tre volte per un totale di quattro lavaggi. Invertire la piastra e batterla su materiale assorbente per rimuovere residui di liquido dell'ultimo lavaggio. Non asciugare i pozzetti completamente.
- Aggiungere 100µL di Coniugato in ogni pozzetto.
- Incubare i pozzetti per 30 minuti.
- Fase di lavaggio: Ripetere la procedura 7.
- Aggiungere 100µL di Substrato Enzimatico in ogni pozzetto.
- Incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere 100µL di Soluzione di Stop in ciascun pozzetto. Per l'aggiunta della Soluzione di Stop rispettare lo stesso ordine e gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia contro il bianco impostato su assorbanza 0.

**Controllo di Qualità**

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere  $<0,3$ . Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore  $<20$  EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, prendere la media delle due letture per determinare il valore EU/ml. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve

IT

essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

## RISULTATI

### CALCOLI

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

##### Assorbanza del campione del test

-----X EU/ml del Calibratore D = EU/ml del Campione del Test

##### Assorbanza del calibratore D

#### 2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.

### Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### Interpretazione

Le informazioni che seguono servono unicamente da guida nell'interpretazione dei risultati di laboratorio. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valore anti-LKM1	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminato (Borderline)
>25 EU/ml	Positivo

### LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati ottenuti rappresentano unicamente un elemento di supporto alla diagnosi dell'AIH Tipo 2, considerati singolarmente non hanno valenza diagnostica. Il siero di alcuni pazienti con AIH Tipo 2 possono risultare negativi per gli anticorpi anti-LKM1.

### VALORI ATTESI

Non esiste un singolo marcatore sensibile e specifico per l'AIH. La diagnosi viene effettuata valutando una combinazione di fattori clinici, biochimici e istologici. La presenza di una varietà di autoanticorpi è di aiuto nell'identificazione e nella diagnosi dell'AIH. Basandosi sul tipo di anticorpi presenti, l'AIH può essere suddivisa in due sottotipi. Gli autoanticorpi anti-LKM sono indicatori specifici dell'AIH Tipo 2 (vedere Tabelle 1 e 2 alla fine di questo foglio illustrativo).

### Precisione

Due sieri positivi per LKM1 sono stati testati con il kit LKM1 Immco™ per determinare la variabilità all'interno di un saggio e tra un saggio e l'altro. Vedere Tabella 3 alla fine di questo foglio illustrativo.

### Recupero

I campioni con concentrazioni note di LKM1 sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di LKM1. Sono stati determinati i livelli di anticorpi anti-LKM1 nei campioni miscelati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. Vedere Tabella 4 alla fine di questo foglio.



## ELISA para anticorpos anti-microsossomais-1 de fígado/rim (LKM1)

IVD

### FOLHETO DO PRODUTO

REF 1168 ELISA LKM1 96 determinações

#### APLICAÇÃO

Um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção e semiquantificação de anticorpos anti-microsossomas-1 do fígado/rim em soro humano. A presença de anticorpos LKM1 pode ser utilizada como um auxiliar a sintomas clínicos e outros achados laboratoriais no diagnóstico de *hepatite auto-imune*.

#### RESUMO E EXPLICAÇÃO

A *hepatite auto-imune* (HAI) é uma doença hepática inflamatória crónica diferenciada, que se caracteriza pelo ataque do sistema imunitário contra “auto-antígenos”, em particular os que são expressos no fígado<sup>1,2</sup>. Ocorre em ambos os sexos e em todos os grupos etários sendo, no entanto, as mulheres vítimas mais prováveis desta hepatite do que os homens. Nas mulheres, 70% dos casos de hepatite auto-imune diagnosticados ocorrem entre os 15 e 40 anos de idade.<sup>1-4</sup>

A *hepatomegalia* e a *esplenomegalia* são os achados patológicos mais frequentemente associados a hepatite auto-imune. As anomalias do sistema imunitário que marcam a hepatite auto-imune incluem auto-anticorpos contra antígenos hepáticos, hipergamaglobulinemia e um aumento da razão de linfócitos CD4/CD8 no sangue periférico e no fígado. Os anticorpos anti-microsossomas do fígado/rim (LKM1) podem ser induzidos não só por mecanismos auto-ímmunes, como também por fármacos como o *ácido tiénico*, *di-hidralazina*, *halotano*, *fenitoína*, *fenobarbital*, *carbamazepina* e pelas infecções de hepatite C e D.<sup>4-6</sup>

O Grupo Internacional da Hepatite Auto-imune classifica esta doença em dois grupos separados: tipo 1 e tipo 2. Esta diferenciação baseia-se na presença de auto-anticorpos marcadores no soro de doentes afectados.<sup>5</sup> A hepatite auto-imune tipo 1 caracteriza-se pela presença de auto-anticorpos anti-nucleares (ANA) e auto-anticorpos anti-músculo liso (SMA). O tipo 1 é o tipo mais comum de hepatite auto-imune, contribuindo para 60–70% dos doentes com esta doença. O tipo 2 é, de alguma forma, uma doença mais rara (a prevalência de hepatite auto-imune tipo 2 é de cerca de 10 casos por milhão), caracteriza-se pela presença de auto-anticorpos contra antígenos microsossomais do fígado e rim (LKM) e pela ausência de ANA e SMA<sup>3</sup>. 70% destes doentes são jovens e têm 2 a 14 anos no início da doença. As consequências da hepatite auto-imune são graves: caracteristicamente, um início agudo que progride rapidamente para cirrose e insuficiência hepática.

O auto-antígeno associado aos anticorpos anti-LKM1 é o citocromo P4502D6. Os anticorpos anti-LKM1 ocorrem predominantemente em doentes com hepatite auto-imune, embora possam ser igualmente detectados em alguns doentes com infecção pelo VHC<sup>7-10</sup>. O ensaio para anticorpos anti-LKM1 Immco™ utiliza um antígeno específico de forma a garantir um elevado grau de especificidade para a hepatite auto-imune.<sup>7-10</sup>

\*fabricado ao abrigo da patente n.º 5,830,067

#### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O antígeno LKM1 é ligado aos poços de uma placa de micropoços de poliestireno; segue-se o bloqueio dos locais não reactivos para redução da ligação não específica. Os controlos, calibradores e soros de doentes diluídos foram adicionados a poços separados, permitindo a ligação de anticorpos LKM1 presentes ao antígeno imobilizado. A amostra não ligada é removida por lavagem e é adicionado a cada poço um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima. Estes anticorpos conjugados com enzima ligam-se especificamente à imunoglobulina humana da classe IgG. Após a remoção por lavagem do conjugado não ligado, é adicionado aos poços um substrato enzimático específico (pNPP). Após a paragem da reacção enzimática, é lida a intensidade da mudança de cor, proporcional à concentração de anticorpos, por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são expressos em unidades de enzima por mililitro (UE/ml).

## REAGENTES

### Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes a uma temperatura entre 2 e 8 °C. **Não congele.** Não utilize se o reagente não estiver límpido ou se existir algum precipitado. Todos os reagentes têm de estar à temperatura ambiente (20-25 °C) antes de serem utilizados. Desde que conservado a uma temperatura entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído mantém-se estável até ao fim do prazo de validade do kit. Reconstitua o tampão de lavagem com 1 l de água destilada ou desionizada. As tiras de micropoços revestidas destinam-se a ser utilizadas uma única vez.

### Precauções

Para diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes obtidos a partir de seres humanos foram testados relativamente à presença de HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 e HTLV-I, tendo-se obtido resultados negativos em testes exigidos pela FDA. Porém, os derivados de sangue humano e as amostras de doentes devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação destes materiais<sup>11</sup>. **ADVERTÊNCIA** — A azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Elimine os líquidos com um grande volume de água para impedir a acumulação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica por ingestão. Em caso de ingestão, avise imediatamente o director do laboratório ou o centro anti-venenos.

**Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo do kit.** Não troque componentes do kit com componentes de outras origens que não tenham o mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Empregue boas práticas de laboratório para minimizar a contaminação microbiana e química. Não utilize após o fim do prazo de validade.

### Materiais fornecidos

ELISA LKM1 ImmuLisa™ REF 1168

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.









12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>LKM1</b>	<b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador A pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador B pronto a usar</b> ( <i>tampa violeta</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador C pronto a usar</b> ( <i>tampa azul</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>LKM1</b> *	<b>Calibrador D pronto a usar</b> ( <i>tampa amarela</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>LKM1</b> *	<b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Contém soro humano positivo para LKM1.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	<b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado com fosfatase alcalina anti-humano</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de soro</b> pronto a usar. Cor azul.

PT

1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> pronto a usar. Contém pNPP. <b>Proteger da luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solução de paragem</b> pronta a usar.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampão de lavagem em pó.</b> Reconstituir cada unidade em um litro.

\* Contém < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Símbolos utilizados nos rótulos:

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

#### Materiais necessários mas não fornecidos

- Pipetas com capacidade para distribuir 5 a 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis
- Tubos de ensaio de 12 x 75 mm, limpos, e respectivo suporte
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade para leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver disponível um leitor de microplacas com duplo comprimento de onda, o filtro de referência deve ser definido para 600-650 nm.
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Temporizador
- Papel absorvente
- Dispositivo automático de lavagem de micropipetas com capacidade para distribuir 200 µl

#### COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. Amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser utilizadas. Conserve as amostras a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante um período não superior a uma semana. Para um período de armazenamento mais prolongado, é necessário congelar as amostras de soro. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.

#### PROCEDIMENTO

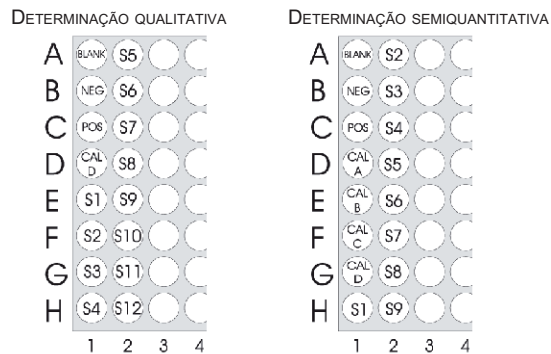
##### Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente estas instruções antes de começar o ensaio.
- Coloque os reagentes e as amostras à temperatura ambiente (20–26 °C) durante 30 min. Imediatamente após a utilização, volte a colocar os materiais no frigorífico.

- Prepare todas as diluições das amostras de doentes antes de dar início ao teste.
- **Volte a colocar imediatamente as tiras não usadas na bolsa com dessecante e feche bem para minimizar a exposição a vapor de água.**
- Passo de lavagem: uma boa técnica é fundamental. **Recomenda-se um dispositivo automático de lavagem de microplacas.**
- Utilize uma pipeta multicanal com capacidade para distribuir em simultâneo material para 8 poços. Isto acelera o processo e permite um tempo de incubação mais uniforme.
- É importante controlar cuidadosamente o tempo. Os períodos de incubação começam após a distribuição de reagentes.

### Procedimento de ensaio

1. **TODOS OS REAGENTES TÊM DE ESTAR À TEMPERATURA AMBIENTE (20-25 °C) ANTES DE COMEÇAR O ENSAIO.**
2. Indique na folha do protocolo a posição das amostras na microplaca. Faz parte das boas práticas de laboratório executar os testes das amostras em duplicado.
3. **Determinação qualitativa:** utilize apenas o calibrador D. **Determinação semiquantitativa:** utilize os calibradores A–D como mostrado no exemplo abaixo.



4. Prepare uma diluição a **1:101** da amostra do doente misturando **5 µl** de amostra do doente com **0,5 ml** de diluente de soro.
5. Adicione **100 µl** de calibradores, controlos negativo e positivo e a amostra do doente diluída aos micropoços adequados indicados na folha do protocolo.  
**Nota:** inclua também um poço com **100 µl** de diluente de soro como um branco de reagente. Ponha o leitor de ELISA a zero em relação ao branco de reagente.
6. Incube durante **30 min** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente numa superfície plana.
7. Passo de lavagem: aspire totalmente o conteúdo de cada poço. Adicione 200–300 µl de tampão de lavagem **reconstituído** a todos os poços e, em seguida, aspire. Repita mais três vezes esta sequência, num total de quatro lavagens. Inverta e bata ligeiramente com a placa sobre um material absorvente para remover qualquer resíduo de líquido que possa existir depois da última lavagem. Não seque completamente os poços.
8. Adicione 100 µl de conjugado a cada poço.
9. Incube os poços durante 30 min.
10. Passo de lavagem: repita o passo 7.
11. Adicione 100 µl de substrato enzimático a cada poço.
12. Incube durante 30 min à temperatura ambiente.

PT

13. Adicione 100 µl de solução de paragem a cada poço. Para adição da solução de paragem, mantenha a mesma sequência e tempos usados para o substrato enzimático. Leia a absorvância (DO) de cada poço a 405 nm no prazo de uma hora após ter parado a reacção.
14. Leia a absorvância (DO) de cada poço a 405 nm usando um leitor de microplacas de comprimento de onda único ou simples contra o branco de reagente num valor de absorvância zero.

#### Controlo de qualidade

Para cada ensaio realizado é necessário executar os calibradores, os controlos positivo e negativo e um branco de reagente para confirmação da integridade e exactidão do teste. A leitura de absorvância do branco de reagente deve ser < 0,3. O calibrador A deve ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário, o teste tem de ser repetido. O controlo negativo tem de ser < 20 UE/ml. Se o teste for executado em duplicado, utilize a média das duas leituras para determinar as UE/ml. Durante a execução de determinações qualitativas, a densidade óptica do calibrador D tem de ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvância do controlo positivo. No caso de determinações semiquantitativas, os valores do controlo positivo têm de se situar no intervalo indicado no frasco.

### RESULTADOS

#### Cálculos

As concentrações das amostras de doentes podem ser determinadas por um de dois métodos:

#### 1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

$$\frac{\text{Absorv. da amostra de teste}}{\text{Absorv. do calibrador D}} \times \text{UE/ml do calibrador D} = \text{UE/ml da amostra de teste}$$

#### 2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Trace em papel milimétrico linear um gráfico tendo como eixos as absorvâncias dos calibradores A a D e as respectivas concentrações. Represente a concentração em UI/ml no eixo X e a absorvância no eixo Y e desenhe a curva de melhor ajuste linear. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva relacionando-as com os valores de absorvância correspondentes.

#### Calibrador

Os calibradores são fornecidos para permitir determinações semiquantitativas e têm de ser utilizados em cada execução do ensaio. As amostras de doentes que contenham níveis de anticorpos mais elevados podem produzir valores de absorvância superiores aos do calibrador A. Para determinar os valores semiquantitativos exactos, essas amostras de soro devem ser ainda mais diluídas de modo a que os resultados se situem dentro do intervalo da curva de calibração quando forem novamente testadas. Para determinar as UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

#### Interpretação

A informação indicada constitui apenas um guia para interpretação dos resultados laboratoriais. Cada laboratório deve determinar os seus valores normais.

Valor anti-LKM1	Interpretação
< 20 UE/ml	Negativo
20–25 UE/ml	Indeterminado (no limiar)
> 25 UE/ml	Positivo

#### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os resultados obtidos servem apenas como auxiliar no diagnóstico e não devem ser interpretados como sendo eles próprios diagnósticos. O soro de alguns doentes com hepatite auto-imune de tipo 2 pode ser negativo para os anticorpos anti-LKM1.

PT

## **VALORES ESPERADOS**

Não há um marcador único específico e sensível para a hepatite auto-imune. O diagnóstico é feito através da combinação de características clínicas, bioquímicas, serológicas e histológicas. A presença de vários auto-anticorpos ajuda a identificar e a diagnosticar a hepatite auto-imune. Com base no tipo de anticorpos presente, a hepatite auto-imune pode dividir-se em subtipos. Os auto-anticorpos anti-LKM1 são indicadores específicos de hepatite auto-imune tipo 2 (ver tabelas 1 e 2 na parte final deste documento).

### **Precisão**

Foram testados com o ensaio LKM1 Immco™ dois soros positivos para LKM1, para determinar a variabilidade intra-ensaio e inter-ensaios. Ver tabela 3 na parte final deste documento.

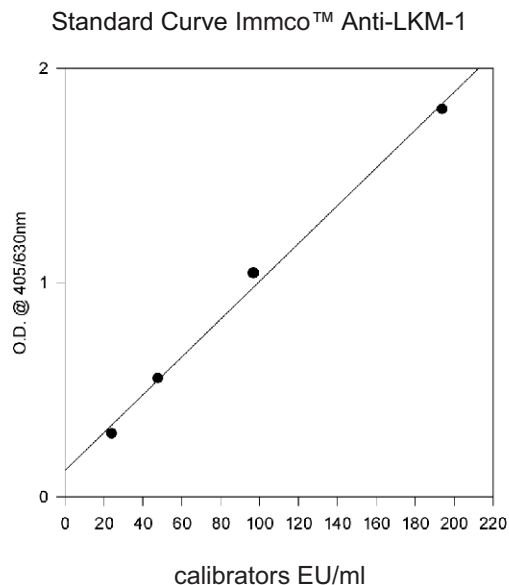
### **Recuperação:**

Amostras com concentrações de LKM1 conhecidas foram misturadas com diluições adequadas de outra amostra positiva com níveis de LKM1 conhecidos. Foram determinados os níveis de LKM1 das amostras misturadas e a partir desses valores foi calculada a percentagem de recuperação. Ver tabela 4 na parte final deste documento.

## REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Meyer zum Büschenfelde KH, Dienes, HP. Autoimmune hepatitis, definition – classification – histopathology – immunopathogenesis. *Virchows Arch* 429:1-12, 1996.
2. Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 28:360-365, 1998
3. Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L et al. Primary biliary cirrhosis – autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. *Hepatology* 28:297-301, 1998.
4. van den Berg AP. Autoimmune hepatitis: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Scand J Gastroenterol* 225:66-9, 1998.
5. Czaja AJ. Diagnosis and therapy of autoimmune liver disease. *Med Clin North Am* 80:973994, 1996.
6. Yamamoto AM, Cresteil D, Homberg JC and Alvarez F. Characterization of anti-liverkidney microsome antibody (Anti-LKM1) from hepatitis C virus – positive and – negative sera. *Gastroenterol* 104:1762-1767, 1993.
7. Choudhuri K, Gregorio GV, Mieli-Vergani G, and Vergani D. Immunological cross-reactivity to multiple autoantigens in patients with liver kidney microsomal type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 28:1177-1181, 1998.
8. Ma Y, Peakman M, Lobo-Yeo A et al. Differences in immune recognition of cytochrome P4502D6 by liver kidney microsomal (LKM) antibody in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 97:94-99, 1994.
9. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF and Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J. Clin Invest* 88:1370-1378, 1991.
10. Gueguen M, Boniface O, Bernard O et al. Identification of the main epitope on human cytochrome P450IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *J Autoimm* 4:607-615, 1991.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].

**Figure 1. Sample Standard Curve**



**Table 1. Antibodies in Autoimmune Hepatitis**

Type of Antibody	<i>Antibodies in Autoimmune Hepatitis</i>	
	Incidence (%)	
	Type 1	Type 2
Anti-nuclear Antibody (ANA)	60	0
Smooth Muscle Antibody	70	0
Liver Kidney Microsomal Antibody (LKM1)	0	100

From van Den Berg, Autoimmune Hepatitis, pathogenesis, diagnosis and treatment, Scand J Gastroenterol, 1998; 33 suppl 225; 66-69.

**Table 2. Autoantibodies to LKM 1 antigen by ELISA can be detected in almost all cases of AIH and in none with HCV infection induced hepatitis.**

	Indirect IF	ELISA
AIH	100%	>95%
HCV Infection	1.5%	0%

**Table 3: Precision**

	inter-assay	intra-assay
	%CV	%CV
Sample 1	7.2	5.0
Sample 2	8.5	7.0

**Table 4: Recovery**

	LKM1 conc. added (EU/ml)	LKM1 conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	121.2	128.7	106.2
Sample 2	102.4	112.1	109.5
Sample 3	63.3	61.4	97.0





*For technical assistance please contact:*

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immco.com](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)