



Anti-Liver-Kidney Microsomal (LKM1) Antibody ELISA*

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1168

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^{1,2}. 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 40.¹⁻⁴

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.⁴⁻⁶

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.⁵ 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 SMA³. 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 infection⁷⁻¹⁰. The IMMCO anti-LKM1 assay uses specific antigen to assure a high degree of specificity for AIH.⁷⁻¹⁰

* 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 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 materials¹⁷. **WARNING** - Sodium azide (NaN₃) 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.

Use good laboratory techniques to minimize microbial and chemical contamination. Do not use after expiration date.

Materials provided

IMMCO LKM1 ELISA **REF** 1168

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

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

* Contains < 0.1% NaN₃

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.

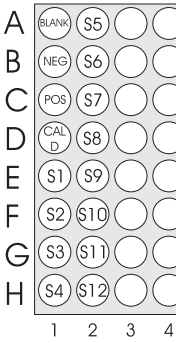
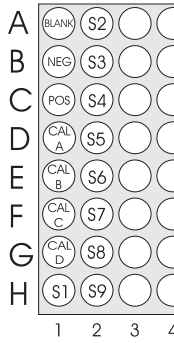
PROCEDURE

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

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

QUALITATIVE DETERMINATION**SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION**

4. Prepare a **1:101** dilution of the patient specimen by mixing **5 µl** of the patient specimen with **0.5 ml** of Serum Diluent.
 5. 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.
6. Incubate **30 minutes** (± 5 minutes) at room temperature on a level surface.
 7. 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.
 8. Add 100µL of the Conjugate to each well.
 9. Incubate the wells for 30 minutes.
 10. Wash step: Repeat step 7.
 11. Add 100µL of Enzyme Substrate to each well.
 12. Incubate for 30 minutes at room temperature.
 13. 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.
 14. 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.

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.



Anti-LKM1 ELISA*

IVD

REF 1168

96 Determinations

ImmuLisTM anti-LKM1 est un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) pour la détection semi-quantitative des anticorps contre tTG dans le sérum humain. La présence d'anticorps au micrososome du foie ou du rein (LKM-1) peut être utilisée dans le diagnostic de l'hépatite chronique active auto-immune.

SOMMAIRE ET EXPLICATION

L'hépatite autoimmune (AIH) est une affection hépatique inflammatoire chronique distincte, caractérisée par l'attaque du système immunitaire dirigé contre des antigènes d'"individu", particulièrement ceux exprimés dans le foie ^{1, 2}. Elle se produit dans les deux sexes et toutes les catégories d'âge, cependant, des femmes sont des victimes plus probables d'AIH que des hommes. Chez les femmes, 70 % de caisses diagnostiquées d'AIH se produisent entre les âges de 15 et de 40. ¹⁻⁴

L'hépatomégalie et *la splénomégalie* sont les résultats pathologiques les plus communs liés à AIH. Anormalités du système immunitaire qui marquent AIH incluent des autoanticorps aux antigènes de foie, *hyper-gammaglobulinémie*, et un rapport CD4/CD8 accru dans le sang périphérique et le foie. Des anticorps microsomes du foie et du rein (LKM1) peuvent être induits non seulement par les mécanismes autoimmuns, mais également par des drogues telles que *l'acide tienic, dihydralazine, halothane, phénytoin, phénobarbital, carbamazépine* et par les infections hépatite C et D. ⁴⁻⁶

Le groupe autoimmun international d'hépatite classe AIH par catégorie dans deux groupes séparés de la maladie : Type 1 et type 2. Cette distinction est basée sur la présence des autoanticorps de marqueur en sérum des patients affectés. Le type 1 de AIH est caractérisé par les autoanticorps antinucléaires (ANA) et les anticorps de muscle lisse (SMA) ⁵. Le type 1 est le type plus commun d'AIH, la comptabilité pour 60-70% de patients avec AIH. Type 2 est une maladie légèrement plus rare (le prevalence du AIH type 2 est environ 10 cas par million) caractérisée par la présence des autoanticorps contre les antigènes microsomiques du foie et du rein (LKM) et l'absence d'ANA et de SMA ³. 70% de ces patients sont jeunes, de 2 à 14 ans de au début. Les conséquences du AIH type 2 sont graves : typiquement, le début aigu progresse rapidement à l'échec de cirrhose et de foie. L'autoantigène lié aux anticorps LKM1 est des anticorps du cytochrome P450D6. L'anticorps à LKM1 se produisent principalement dans les patients avec AIH mais peuvent également être détectés dans quelques patients présentant l'infection de HCV⁷⁻¹⁰. L'analyse de IMMCO anti-LKM1 emploie l'antigène spécifique pour assurer un degré élevé de la spécificité pour AIH.⁷⁻¹⁰

* construit sous le brevet # 5.830.067

PRINCIPE DU TEST

L'antigène LKM-1 est fixé sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène. La plaque est bloquée pour réduire l'attache non spécifique. Les contrôles, les étalons et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les anticorps anti-LKM-1 présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Ces anticorps lient spécifiquement à l'immunoglobuline humaine de la classe IgG. 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 anti-LKM-1 sera déterminée en comparant la densité optique de l'échantillon à celle d'une courbe d'étalonnage à quatre points. Les résultats sont enregistrés de façon semi-quantitative en unités ELISA/millilitre (EU/ml) .

CONTENU DU COFFRET

Conditions de conservation

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.

N'employez pas si le réactif n'est pas clair.

Tampon de lavage: Ajoutez l'eau distillée ou désionisée pour le volume de 1L.

Micropuits: Employez une fois seulement.

Précautions

Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.

L'azide de sodium (NaN_3) est utilisé comme conservateur. NaN_3 est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.

Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.

Employez les bonnes techniques de laboratoire pour réduire au minimum la contamination microbienne et chimique.

N'employez pas après date d'échéance.

Matériel fourni

IMMCO LKM-1 ELISA **REF** 1168

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 déterminations chacune.

12 x 8	MICROPLATE LKM-1	barettes de 96 micropuits individuels, revêtue d'antigène LKM-1
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A LKM-1 *	étalon A (chapeau vert), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B LKM-1 *	étalon B (chapeau violet), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C LKM-1 *	étalon C (chapeau bleu), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D LKM-1 *	étalon D (chapeau jaune), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CONTROL + LKM-1 *	contrôle positif (chapeau rouge), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	contrôle négatif (chapeau blanc), prêt à l'emploi, contient le sérum humain
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	conjugué phos. alc. Rose codé par couleur.
1 x 60 ml	DIL *	diluant pour échantillons. Bleu codé par couleur.

1 x 12 ml **SUBSTRATE ***

substrat enzymatique. Contient le pNPP.

Protéger contre la lumière.

1 x 12 ml **STOP**

solution d'arrêt

2 **BUF WASH**

tampon de lavage pour 1 litre/flacon

* Contient < 0.1% NaN₃

Autre matériel nécessaire non fourni

- Pipettes pour 5- 1000 µl
- Cônes jetables
- Tubes de 4ml pour la dilution de sérum
- Eau distillée ou déionisée
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm
- Bouteille pour le tampon de lavage
- Temporisateur
- Papier absorbant

Echantillons

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter. Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Évitez la congélation répétée et le dégel.

MÉTHODE

Préparation du test

- Avant de commencer l'analyse a lu ces instructions soigneusement.
- Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) pendant 30 minutes avant de les utiliser. Matériaux de retour au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des spécimens patients avant de commencer l'essai.
- **Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.**
- Lavage: La bonne technique est critique. Une rondelle automatisée de plaque microtitration ELISA est recommandée.
- Utiliser une pipette multicanale capable de fournir 8 positions simultanément. Ceci expédie le processus et prévoit un temps plus uniforme d'incubation.
- La synchronisation soigneuse est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution du réactifs.

Exécution du test

1. **PORTER TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS À TEMPERATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT DE LES UTILISER.**
2. Employer le page de protocole pour noter la position des spécimens dans le plaque microtitration. Il est dans de bons habitudes de laboratoire d'examiner des spécimens deux fois.
3. **Détermination qualitative :** employer seulement étalon D.
Détermination semi - quantitative : employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.

Détermination qualitative :**Détermination semi - quantitative :**

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

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. Préparez une dilution de **1:101** du spécimen patient en mélangeant **5 µl** du spécimen patient à **0.5 ml** de diluant pour échantillons.
 5. Distribuer 100 µl des étalons, des échantillons de patients dilués, des contrôles négatif et positif dans les puits.
- Note :** Incluez une position avec **100 µl** du diluant pour échantillons comme blanc de réactif. La valeur nulle du lecteur de plaque microtitration devrait être placée en utilisant cette position.
6. Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
 7. Lavage: aspirer le contenu de tous les puits. Ajouter 200-300µl de tampon dans tous les puits et l'aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération trois fois supplémentaires pour un total de quatre lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Ne séchez pas les puits complètement.
 8. Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque puits.
 9. Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
 10. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 7.
 11. Distribuer 100 µl de substrat enzymatique dans chaque puits
 12. Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
 13. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. 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 puits à 405nm en utilisant un lecteur simple ou duel de plaque microtitration de longueur d'onde contre l'ensemble blanc de réactif à l'absorbance nulle.

RÉSULTATS**Calcul des résultats**

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

1. DÉTERMINATION QUALITATIVE

D.O. de Spécimen

X EU/ml de étalon D = EU/ml de Spécimen

D.O. de Étalon D

2. DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Absorbance de parcelle de terrain de étalon A à D contre leur concentration respective sur un papier graphique linéaire-linéaire. Tracez la concentration dans EU/ml sur l'X-axe contre l'absorbance sur l'Y-axe et dessinez la meilleure courbe convenable. Déterminez les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe contre sa valeur correspondante d'absorbance.

Étalons

Les étalons sont inclus pour fournir semi - quantitation et doivent être employés avec chaque essai. Les spécimens patients contenant des niveaux plus élevés d'anticorps peuvent donner à des valeurs d'absorbance plus grandes que cela du étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises que de tels spécimens devraient être encore dilués ainsi ils font partie de la marge de la courbe d'étalonnage une fois essayés de nouveau. Pour la détermination de EU/ml, multipliez 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.

anti-LKM1	Interpretation
<20 EU/ml	Negatif
20-25 EU/ml	Indéterminé
>25 EU/ml	Positif

LIMITATIONS

Les résultats obtenus servent seulement comme une aide dans le diagnostic du type 2 d'AIH et ne devraient pas être interprétés en tant que diagnostic dans eux-mêmes. Le sérum du type 2 patients d'un certain AIH peut être négatif pour les anticorps anti-LKM1.

VALEURS PRÉVUES

Il n'y a aucun sensible et le marqueur spécifique pour AIH. Diagnostic est fait à partir d'une combinaison des dispositifs cliniques, biochimiques, sérologiques et histologiques. La présence d'une variété d'aides d'autoanticorps dans l'identification et le diagnostic d'AIH. Sur le type d'anticorps actuels, AIH peut être divisée en sous-types. Les autoanticorps à LKM1 sont les indicateurs spécifiques du type 2 AIH (voir les tableaux 1 et 2 à la fin de ce document).

Précision

Deux sérums LKM1 positifs ont été examinés avec le IMMCO LKM1 pour déterminer la variabilité inter- et d'intra-analyse. Voir le tableau 3 à la fin de ce document.

Rétablissement

Des échantillons avec les concentrations LKM1 connues ont été mélangés aux dilutions appropriées d'un autre échantillon positif avec des quantités connues de LKM1. LKM1 que des niveaux des échantillons mélangés ont été déterminés et à partir des valeurs a obtenu le rétablissement de pour cent calculé. Voir le tableau 4 à la fin de ce document.



Anti-LKM1 ELISA*

IVD

REF 1168

96 Determinations

ImmuLisTM anti-LKM1 es un ensayo basado en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para la detección semi cuantitativa de anticuerpos antimicrosomales de hígado o riñón (LKM-1). La detección de estos anticuerpos resulta útil para la diagnosis de la hepatitis autoinmune.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La hepatitis autoinmune (AIH) es una enfermedad del hígado inflamatoria crónica distinta, caracterizada por el ataque del sistema inmune dirigido contra los antígenos del “uno mismo”, especialmente éstos expresados en el hígado^{1,2}. Ocurre en ambos sexos y todas las categorías de edad, sin embargo, las mujeres son víctimas más probables de AIH que hombres. En mujeres, 70 % de cajas diagnosticadas de AIH ocurren entre las edades de 15 y 40.¹⁻⁴

El hepatomegalia y la esplenomegalia son los resultados patológicos más comunes asociados a AIH. Abnormalities del sistema inmune que marcan AIH incluyen autoanticuerpos a los antígenos del hígado, *hiperactivos-gammaglobulinemia*, y un cociente creciente CD4/CD8 en sangre periférica e hígado. Los anticuerpos antimicrosomales de hígado o riñón (LKM1) se pueden inducir no solamente por los mecanismos autoinmunes, pero también por las drogas tales como *ácido tienic, dihydralazine, halothane, phenytoin, phenobarbital, carbamazepine* y por infecciones de hepatitis C e D.⁴⁻⁶

El grupo autoinmune internacional de la hepatitis categoriza AIH en dos grupos separados de la enfermedad: Tipo 1 y tipo 2. Esta distinción se basa en la presencia de los autoanticuerpos del marcador en el suero de pacientes afectados. el tipo 1 de AIH es caracterizado por los autoanticuerpos antinucleares (ANA) y los anticuerpos del antimusculo liso (SMA)⁵. El tipo 1 es el tipo más común de AIH, la contabilidad para 60-70% de pacientes con AIH. Type 2 es una enfermedad algo más rara (el prevalencia del tipo 2 de AIH es cerca de 10 casos por millón) caracterizada por la presencia de autoanticuerpos contra los antígenos microsomales del hígado y del riñón (LKM) y la ausencia de ANA y de SMA³. los 70% de estos pacientes son jóvenes, a partir 2 a 14 años de viejo en el inicio. Las consecuencias del tipo 2 AIH son severas: típicamente, el inicio agudo progresa rápidamente a la falta de la cirrosis y del hígado.

El autoantígeno asociado a los anticuerpos LKM1 es anticuerpos del cytochrome P4502D6. Anticuerpos a LKM1 ocurre predominante en pacientes con AIH pero se puede también detectar en algunos pacientes con la infección de HCV⁷⁻¹⁰. El análisis de IMMCO anti-LKM1 utiliza el antígeno específico para asegurar un alto grado de la especificidad para AIH.⁷⁻¹⁰

* fabricado bajo patente # 5.830.067

PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

Los pocillos de la microplaca contienen antígeno LKM-1. La microplaca se bloquea para reducir reacciones no específicas. Se añaden controles, calibradores y muestras diluidas en pocillos separados, uniéndose durante la incubación los anticuerpos anti LKM-1 al antígeno que los recubre. El resto de componentes no unidos se elimina mediante lavado y se añade conjugado anti IgG humana a cada pocillo. Este la enzima conjugó los anticuerpos ata específicamente a la inmunoglobulina humana de la clase IgG. Tras un lavado que elimina el conjugado sobrante, se agrega el substrato enzimático específico (pNPP). Tras incubación la actividad enzimática presente en el pocillo es proporcional a la intensidad de color desarrollado. Se determina la presencia o ausencia de anticuerpos contra la LKM-1 por

medio de la comparación de la densidad óptica de la muestra con la de una curva de calibración de cuatro puntos. Los resultados se dan a conocer de forma semicuantitativa en unidades ELIZA (EU/ml).

REACTIVOS

Condiciones de Almacenaje

Guardar todos los reactivos del kit en nevera a 2-8°C. No congelar. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados y manipulados correctamente. No utilizar si el reactivo no está claro.

Tampón de lavado: Agregar el agua destilada o desionizada para el volumen del 1L.

Micropocillos: Utilizar una vez solamente.

Precauciones

Todo material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto se ha examinado resultando negativo para anticuerpos contra HIV, HbsAg, y HCV por métodos aprobados por la FDA. Ningún método puede sin embargo ofrecer garantía completa que HIV, HBV, HCV o otros agentes contagiosos estén ausentes. Por lo tanto, los reactivos deben manejarse como si fueran material potencialmente contagioso.

Dado que se utiliza azida sódica como conservante, este producto puede ser tóxico por ingestión o absorción a través de piel o mucosas. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si se utilizan desagües para la eliminación de reactivos se recomienda lavarlos con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas metálicas.

La sustitución de componentes diferentes de los incluidos en el sistema puede generar resultados inconsistentes.

Utilizar las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química.

No utilizar después de fecha de vencimiento.

Materiales Suministrados

IMMCO LKM-1 ELISA

REF

1168

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 96 determinaciones.

12 x 8	MICROPLATE LKM-1	Microplaca con los micropocillos disidentes individuales cubrió con el antígeno del LKM-1 .
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A LKM-1 *	Calibrador A (<i>casquillo verde</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B LKM-1 *	Calibrador B (<i>casquillo violeta</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C LKM-1 *	Calibrador C (<i>casquillo azul</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D LKM-1 *	Calibrador D (<i>casquillo amarillo</i>), listo para uso. Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + LKM-1 *	control positivo, listo para uso. (<i>casquillo rojo</i>). Contiene suero humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	control negativo, listo para uso. (<i>casquillo blanco</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	conjugado fos. alc. Color de rosa cifrado color.
1 x 60 ml	DIL *	tampón de dilución para muestras. Azul cifrado color.

1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzimático. Contiene el pNPP. Proteger contra luz.
1 x 12 ml	STOP	solución de parada
2	BUF WASH	tampón de lavado para 1 litro/vial
* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN ₃		

Material necesario no incluido

- Micropipetas para 5 - 1000µl
- Puntas desechables para micropipeta
- Tubos para dilución de muestras, 4ml
- Agua destilada
- Lector de microplacas capaz de medir densidades ópticas a 405nm
- Botella para tampón de lavado
- Contador de tiempo
- Papel absorbente

Recolección de Muestras

Este kit requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras contaminadas, tratadas por calor o que contengan partículas visibles. Deben asimismo evitarse las muestras lipémicas o hemolizadas.

Guardar las muestras a temperatura ambiente no más de 8 horas. Si el ensayo no se va completar en 8 horas, refrigerar la muestra a 2-8°C. Si el ensayo no se va completar entre 48 horas, o para enviar las muestras, congelar a -20°C o a temperatura inferior. Evitar congelar repetido y deshelar.

PROCEDIMIENTO

Notas Procesales

- Antes comenzando con el análisis leer cuidadosamente el relleno del producto.
- Dejar los especímenes del suero y los reactivos de la prueba equilibrar en la temperatura ambiente antes comenzando con el método de prueba. Volver todos los especímenes y reactivo inusitados al refrigerador inmediatamente después del uso.
- Todas las diluciones de las muestras pacientes se deben preparar antes comenzando con del análisis.
- Quitar requirió tiras del micropocillos de la bolsa y resellan cuidadosamente la bolsa para prevenir la condensación en los pozos inusitados. Volver la bolsa inmediatamente al refrigerador.
- *Lavado: La buena técnica es crítica. Se recomienda una arandela automatizada del microplaca.*
- Utilizar una pipeta de varios canales capaz de entregar 8 pozos simultáneamente. Esto apresura el proceso y preve por un más tiempo uniforme de la incubación.
- Para todos los pasos, el control cuidadoso de la sincronización es importante. El comienzo de todos los períodos de la incubación comienza con la terminación de la adición el reactivo.

Metodología

1. Llevar todos reactivos y muestras a la temperatura ambiente.
2. Indicar la colocación del espécimen en la página del protocolo. Es buena práctica del laboratorio funcionar muestras en duplicado.
3. Determinación cualitativo: Utilizar solamente el calibrador D.
Determinación semi cuantative: Utilizar calibradores A a D según lo representado en la disposición de la muestra abajo.

Determinación cualitativo

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 cuantitave

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

- Preparar una dilución 1:101 de cada muestra a procesar añadiendo 5 µl de muestra a 0.5 ml de tampón de dilución para muestras.
- Agregar 100 µl de los controles, de calibradores, de y las muestras pacientes diluidas a los micropocillos apropiados según protocolo cubre.

Nota: Incluir un pozo que contenga **100 µl** del tampón de dilución para muestras como espacio en blanco el reactivo. Poner a cero a lector de ELISA contra el espacio en blanco el reactivo.

- Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
- Lavado (4x): Aspirar el contenido de cada pocillo. Agregar 200-300µl de solución de lavado a todos pocillos y aspirar. Para el lavado manual, llenar cada micropocillos del almacenador intermedio reconstituido de la colada. Desechar el líquido invirtiendo y golpeando ligeramente fuera del contenido de cada uno el pozo o aspirando el líquido de cada uno bien. Para borrar en el extremo de la colada pasada, de las tiras invertidas y golpear ligeramente los pozos vigoroso en las toallas de papel absorbentes. Para las arandelas automáticas, programar la arandela según las instrucciones del fabricante.
- Agregar 100 µl de conjugado en micropocillos.
- Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
- Lavado: Todos los micropocillos como en 7.
- Agregar 100 µl de substrato enzimático en cada micropocillos en la misma orden y la sincronización que para el conjugado.
- Incubar **30 minutos** (± 5 minutos) en la temperatura ambiente.
- Agregar 100 µl de solución de parada en cada micropocillos usando la misma orden y midiendo el tiempo que para la adición del substrato enzimático. Leer los valores de la absorbencia en el plazo de 1 hora de agregar solución de parada.
- Leer la absorbancia (OD) de cada pocillo a 405nm en un plazo máximo de una hora. Si se desea seguir el método de lectura bicromática puede utilizarse 620 nm como longitud de onda de referencia.

RESULTADOS

Cálculo de Resultados

Las concentraciones de las muestras pacientes se pueden determinar por cualquiera de dos métodos:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

OD Espécimen

OD Calibradore D

X EU/ml de Calibradore D

= EU/ml Espécimen

2. DETERMINACIÓN SEMI-CUANTATIVE

Absorbancia del diagrama de Calibradore A a D contra su concentración respectiva en un papel de gráfico linear-linear. Trazar la concentración en EU/ml en el X-eje contra la absorbancia en el Y-eje y dibujar la mejor curva apta. Determinar las concentraciones de las muestras pacientes de la curva contra su valor correspondiente de la absorbancia.

Calibrador

Los calibradores se incluyen para proporcionar semi - cuantificación y se deben utilizar con cada prueba. Los especímenes pacientes que contienen niveles más altos del anticuerpo pueden dar los valores de la absorbancia mayores que el del Calibradore A. Para que determina valores semi-cuantative exactos tales especímenes debe ser diluido más a fondo así que bajan dentro de la gama de la curva del calibrador cuando están reexaminados. Para determinación EU/ml, multiplicar las unidades obtenidas por el factor de la dilución.

Interpretación

La información siguiente sirve solamente como guía en la interpretación de los resultados del laboratorio. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales.

anti-LKM1	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado
>25 EU/ml	Positivo

LIMITACIONES

Los resultados obtenidos sirven solamente como una ayuda en la diagnosis del tipo 2 de AIH y no se deben interpretar como diagnóstico en sí mismos. El suero del tipo 2 pacientes de algún AIH puede ser negativo para los anticuerpos anti-LKM1.

VALORES PREVISTOS

No hay sensible y el marcador específico para AIH. Diagnosis se hace de una combinación de características clínicas, bioquímicas, serológicas e histológicas. La presencia de una variedad de ayudas de los autoanticuerpos en la identificación y la diagnosis de AIH. En el tipo de los anticuerpos presentes, AIH se puede dividir en subtipos. Los autoanticuerpos a LKM1 son indicadores específicos del tipo 2 AIH (véase las tablas 1 y 2 en el extremo de este documento).

Precisión

Dos sueros positivos LKM1 fueron probados con el IMMCO LKM1 para determinar variabilidad inter y del intra-analisis. Ver la tabla 3 en el extremo de este documento.

Recuperación

Las muestras con las concentraciones sabidas LKM1 fueron mezcladas con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades conocidas de LKM1. LKM1 que los niveles de las muestras mezcladas fueron determinados y de los valores obtuvo la recuperación de los por ciento calculada. Ver la tabla 4 en el extremo de este documento.



Anti-LKM1 ELISA*

IVD

REF 1168

96 Determinations

ImmuLisa™ anti-LKM1 ist ein „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) für die semi-quantitative Bestimmung von Leber-/Nierenmikrosom (LKM-1)-Antikörpern im Humanserum. Die Bestimmung dieser Antikörper dient der Diagnose von autoimmuner Hepatitis bestimmten.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine eindeutige chronische entzündliche Leberkrankheit, gekennzeichnet durch den Angriff des immunen Systems, das gegen „Selbst“ Antigene, besonders die verwiesen wird, die in der Leber ausgedrückt werden^{1, 2}. Sie tritt in beiden Geschlechtern auf und alle Altersklassen jedoch Frauen sind wahrscheinlichere Opfer von AIH als Männer. In den Frauen treten 70 % bestimmte Kästen von AIH zwischen dem Alter von 15 und von 40 auf.¹⁻⁴

Hepatomegalie und *Splenomegalie* sind die allgemeinsten pathologischen Entdeckungen, die mit AIH. Abnormalities des immunen Systems verbunden sind, die AIH einschließen Autoantikörpern zu den Leberantigenen kennzeichnen, *hyper-gammaglobulinemia* und ein erhöhtes Verhältnis CD4/CD8 im Zusatzblut und in der Leber. Leber-Niere mikrosomale (LKM1) Antikörper können nicht nur durch autoimmune Einheiten, aber auch durch Drogen wie *Tienicsäure*, *Dihydralazine*, *Halothane*, *Phenytoin*, *Phenobarbital*, *Carbamazepine* und durch Hepatitis C und D Infektion verursacht werden.⁴⁻⁶

Die internationale autoimmune Hepatitis-Gruppe kategorisiert AIH in zwei verschiedene Krankheitsgruppen: Typ 1 und Art 2. Diese Unterscheidung basiert auf dem Vorhandensein von Markierung Antikörpern im Serum der betroffenen Patienten. Antikörpern der AIH Typ 1 wird durch Antinukleäreantikörpern (ANAs) und Glattmuskelgewebe-antikörpern (SMAs) gekennzeichnet⁵. Typ 1 ist die allgemeinere Art von AIH, ist Buchhaltung für 60-70% von Patienten mit AIH. Type 2 eine ein wenig seltenere Krankheit (Überhandnehmen von AIH Art 2 ist ungefähr 10 Fälle pro Million), gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Antikörpern gegen mikrosomale Antigene der Leber und der Niere (LKM) und das Fehlen ANA und SMA³. 70% dieser Patienten sind jung, von 2 bis 14 Jahre alt am Angriff. Die Konsequenzen der Art 2 AIH sind streng: gewöhnlich kommt akuter Angriff schnell bis zu zirrrose- und Leberausfall weiter.

Das auto antikörpern, das mit Antikörpern LKM1 verbunden ist, ist Zellfarbstoff P4502D6. Antikörper zu LKM1 auftreten überwiegend bei Patienten mit AIH aber können bei einigen Patienten mit HCV Infektion 7-10 auch ermittelt werden. Die IMMCO anti-LKM1 Probe benutzt spezifisches Antigen, um einem hohen Grad von der Besonderheit für AIH zu versichern.⁷⁻¹⁰

hergestellt unter Patent # 5.830.067

TESTPRINZIP

LKM-1 Antigen wurde an die Einzelvertiefungen der Polystyrol-Mikrotiterplatte. Der ohne Reaktion Aufstellungsorte werden blockiert, um unspezifische Reaktionen zu verringern. Kontrollen, Kalibratoren und verdünnte Patientenserum werden in verschiedene Einzelvertiefungen pipettiert. Die vorhandenen LKM-1 Antikörper binden an das Antigen. Der Rest der Probe/Kontrolle wird durch Waschen entfernt. Enzymmarkiertes anti-humane IgG wird in die Einzelvertiefungen pipettiert. Dieses konjugierte Enzym Antikörper binden spezifisch an das menschliche Immunglobulin der IgG Kategorie. Nachdem in einem weiteren Wasch-

schritt das restliche Konjugat entfernt worden ist, wird ein spezifisch Substrat (pNPP) zugegeben. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wird nach dem Abstoppen mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Nach Anhalten der enzymatischen Reaktion von farbigen Produkten die Intensität der Farbe Änderung zur Konzentration des Antikörpers ist proportional. Die Ergebnisse werden semi-quantitativ in ELISA-Standardseinheiten (EU/ml).

INHALT DER TESTPACKUNG

Lagerung

Lagerung aller Kit-Reagenzien bei 2-8°C. Nicht einfrieren. Die Reagenzien sind stabil bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums bei vorschriftsmäßiger Lagerung und Handhabung.
 Nicht verwenden, wenn Reagens nicht frei ist.
 Wäschepuffer: Destilliertes oder entionisiertes Wasser für 1L Volumen hinzufügen.
 Einzelvertiefungen: Nur einmal verwenden.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Reagenzien für die Herstellung dieses Tests wurden auf Antikörper gegen HIV, HBsAg und HCV getestet und für negativ befunden. Dennoch sollten alle humanen Kontrollen wie potentiell infektiöses Humanserum oder Blutproben behandelt werden.
 NaN3 wird als Stabilisator verwendet. NaN₃ ist ein Giftstoff und kann bei Einnahme toxische Reaktionen verursachen. Vorsichtig handhaben und Kontakt mit Augen und Haut vermeiden! Den Kontakt mit Metall, basischen Stoffen oder anderen Komponenten, die mit Säure reagieren können, vermeiden. Bei der Entsorgung von Reagenzien ist daher mit viel Leitungswasser nachzuspülen, um Ansammlungen im Abwassersystem zu verhindern.
 Die Verwendung anderer als im Testkit vorhandenen Komponenten kann zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.
 Gute Labortechniken verwenden, um Mikroben- und chemische Verschmutzung herabzusetzen.
 Nicht nach Verfallsdatum verwenden.

In der Testpackung vorhandenes Material

IMMCO LKM-1 ELISA **REF** 1168

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 96 Ermittlungen jede durchzuführen.

12 x 8	MICROPLATE LKM-1	Mikroplatte mit 96 Einzelvertiefungen besichert mit LKM-1 Antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A LKM-1 *	Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B LKM-1 *	Kalibrator B (<i>violette Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C LKM-1 *	Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D LKM-1 *	Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CONTROL + LKM-1 *	Positive Kontrolle (<i>rote Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Negative Kontrolle (<i>weiße Kappe</i>), gebrauchsfertig, mit humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Alkalische Phosphatase Konjugat. Farbe kodierter Pink.
1 x 60 ml	DIL *	Gepuffertes Probendiluent. Farbe kodiertes Blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Enzym Substrat. Enthält pNPP. Vor Licht schützen.

1 x 12 ml **STOP**
2 **BUF WASH**

Stopplösung
Waschpuffer für je 1 Liter

* enthält < 0.1% NaN₃

Zusätzliches benötigtes Material

- Pipetten für 5 - 1000 µL
- Einmal-Pipettenspitzen
- Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Serumverdünnung, 4 mL Volumen
- Distilliertes oder deionisiertes Wasser
- Reader für Mikrotiterplatten mit 405 nm Filter
- Flasche für Waschpuffer
- Timer
- Saugfähiges Papier

Proben

Die Testdurchführung sollte mit Serumproben erfolgen. Mikrobakteriell kontaminierte, hämolytische, lipämische oder durch Hitzeeinwirkung inaktivierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Proben bei Raumtemperatur nicht länger als 8 Stunden lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 8 Stunden erfolgen, die Proben bei 2-8°C kühl lagern. Kann die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden erfolgen ist die Probe bei -20°C oder niedriger einzufrieren. Das wiederholte Einfrieren und das Auftauen vermeiden.

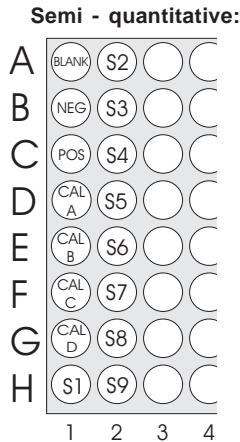
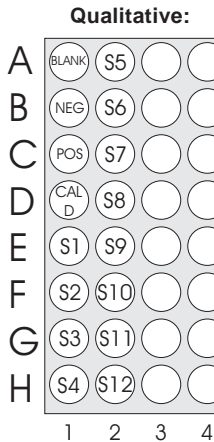
Methode

Testvorbereitung

- Bevor sie begann, las die Probe diese Anweisungen sorgfältig.
- Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen (20-26°C) für 30 Minuten. Rückholmaterialien zum Kühlraum sofort nach Gebrauch.
- Alle Verdünnungen der geduldigen Probestücke vorbereiten, bevor Sie den Test beginnen.
- **Die unbenutzten Kavitäten wieder in die Originalverpackung geben, luftdicht verschließen und in den Kühlschrank zurücklegen, um Verdunstung zu minimieren.**
- Waschen: Gute Technik ist kritisch. Eine automatisierte Mikrotiter-ELISA-Platte Unterlegscheibe wird empfohlen.
- Eine Mehrkanalpipette benutzen, die zu 8 Positionen gleichzeitig liefern fähig ist. Dieses beschleunigt den Prozeß und stellt während einer konstanteren Ausbrütungszeit zur Verfügung.
- Zeit sorgfältig überwachen. Ausbrütung- Perioden fangen an, nachdem sie Reagenzien zugeführt haben.

Testdurchführung

1. **ALLE REAGENZIEN UND PATIENTENPROBEN AUF RAUMTEMPERATUR (20-26°C) BRINGEN.**
2. Protokollaufzeichnung benutzen, um Position der Probestücke zu merken. Es ist gutes Laborüblich, Probestücke in doppelter Ausführung zu prüfen.
3. **Qualitative:** nur Kalibrator D verwenden.
Semi - quantitative: Kalibratoren A - D verwenden, wie im Beispiel unten gezeigt.



4. Eine **1:101** Verdünnung des geduldigen Probestücks vorbereiten, indem Sie **5 µL** des geduldigen Probestücks mit **0.5 ml** von Gepuffertes Probediluent.
5. 100µL von jedem der Kalibratoren, der verdünnten Patientenproben, der Negative Kontrolle und der Positive Kontrolle in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

Anmerkung: Eine Position mit **100 µL** Gepuffertes Probediluent als Reagensfreier Raum einschließen. Der nullwert des Mikrotiter-Platte Lesers sollte mit dieser Position eingestellt werden.

6. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Waschen: Den Inhalt aller Einzelvertiefungen absaugen. Die Einzelvertiefungen vollständig (200-300 µL) mit Waschpuffer füllen und dann gründlich absaugen. Diesen Waschschrift noch dreimal wiederholen (Insgesamt: vier Waschschrirte). Anschließend die Platte auf saugfähigem Papier ausklopfen, um restliche Waschflüssigkeit zu entfernen. Nicht vollständig trocknen.
8. 100 µL des Konjugates in jede Einzelvertiefung geben.
9. Bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
10. Waschen: Schritt Nr. 7 wiederholen.
11. 100 µL Enzym Substrat in jede Einzelvertiefung geben.
12. 30 Minuten bei Raum-temperatur inkubieren.
13. 100 µL Stopplösung in jede Einzelvertiefung pipettieren. Bei der Hinzugabe der Stopplösung dieselbe Reihenfolge und Zeitplan wie bei der Hinzugabe des Enzym Substrat einhalten. Die optische Dichte (OD) innerhalb einer Stunde nach Abstoppen der Reaktion ablesen.
14. Die optische Dichte (OD) jeder Einzelvertiefung bei 405 nm ablesen mit einem einzelnen oder Doppelwellenlänge Mikrotiter-Platte Leser mit dem Reagensfreier Kavität bei null lesen.

ERGEBNISSE

Berechnung der Ergebnisse

Die Konzentrationen der geduldigen Proben können durch irgendeine von zwei Methoden festgestellt werden:

1. QUALITATIVE ERMITTLUNG

OD von Probestück

X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml von Probestück
OD von Kalibrator D

2. SEMIQUANTITATIVE ERMITTLUNG

Die optische Dichte von Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf linear-linearen Zeichenpapier mit Maßeinteilung notieren. Die Konzentration EU/ml auf der X-Mittellinie gegen die Absorption auf der Y-Mittellinie plotten und die beste passende Kurve zeichnen. Die Konzentrationen der geduldgigen Proben von der Kurve gegen seinen entsprechenden Absorption Wert feststellen.

Kalibratoren

Die Kalibratoren sind eingeschlossen, um halb zur Verfügung zu stellen - quantitative Bestimmung und müssen mit jedem Test verwendet werden. Die geduldigen Probestücke, die höhere Antikörperniveaus enthalten, können die Absorption Werte geben, die grösser sind, als das des Kalibrator A. Das genaue semiquantitative Werte solche Probestücke feststellt, weiter verdünnt werden sollte, also sie innerhalb des Bereiches der Kalibratorkurve fallen, wenn sie erneut getestet werden. Für feststellen EU/ml, die Maßeinheiten multiplizieren, die mit dem Verdünnungsfaktor erhalten werden.

Deutung

Die folgenden Informationen dienen nur als Führer in der Deutung der Laborresultate. Jedes Labor muß seine eigenen normalen Werte feststellen.

anti-LKM1	Bedeutung
<20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Grenzbereich
>25 EU/ml	Positiv

BESCHRÄNKUNGEN

Die erreichten Resultate dienen nur wie ein Hilfsmittel in der Diagnose von AIH Art 2 und sollten nicht als Diagnose in selbst gedeutet werden. Serum der irgendein AIH Art 2 Patienten kann für Antikörper anti-LKM1 negativ sein.

ERWARTETE WERTE

Es gibt kein empfindliches und spezifische Markierung für AIH. Diagnose wird von einer Kombination der klinischen, biochemischen, serologischen und histologischen Eigenschaften gebildet. Das Vorhandensein einer Vielzahl der Autoantikörpern in der Kennzeichnung und in der Diagnose von AIH helfen. Auf der Art der vorhandenen Antikörper, AIH kann in Formationsglieder geteilt werden. Autoantikörpern zu LKM1 sind spezifische Anzeigen der Art 2 AIH (Tabellen 1 und 2 am Ende dieses Dokumentes sehen).

Präzision

Zwei positive Seren LKM1 wurden mit dem IMMCO LKM1 geprüft, um Zwischen- und Intra-Probe Veränderlichkeit festzustellen. Tabelle 3 am Ende dieses Dokumentes sehen.

Wiederaufnahme

Proben mit bekannten Konzentrationen LKM1 wurden mit passenden Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit bekannten Mengen von LKM1. LKM1 gemischt, das Niveaus der Mischproben festgestellt wurden und von den Werten erreichte die errechnete Prozentwiederaufnahme. Tabelle 4 am Ende dieses Dokumentes sehen.



Anti-LKM1 ELISA*

IVD

REF 1168

96 Determinations

ImmuLisa™ anti-LKM1 è un test immunoenzimatico per la ricerca semi-quantitativa di anticorpi anti-microsomi epatici e renali (LKM-1) nel siero umano. La rilevazione di questi anticorpi rappresenta un aiuto nella diagnosi di L'epatite autoimmune.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

L'epatite autoimmune (AIH) è un'affezione epatica infiammatoria cronica distinta, caratterizzata tramite l'attacco del sistema immune diretto contro gli antigeni "di auto", particolarmente quelli espressi nel fegato^{1,2}. Si presenta in entrambi i sessi e tutti i gruppi d'età, tuttavia, donne sono vittime più probabili di AIH che gli uomini. In donne, 70% delle casse diagnosticate di AIH si presentano fra le età di 15 e di 40.¹⁻⁴

L'epatomegalia e *lo splenomegalia* sono i risultati patologici più comuni connessi con AIH. L'Abnormalities del sistema immune che contrassegnano AIH includono i autoanticorpi agli antigeni del fegato, *iper-gammaglobulinemia* e un rapporto aumentato CD4/CD8 in anima periferica e fegato. Gli anticorpi microsomi epatici e renali (LKM1) possono essere indotti non soltanto dai meccanismi autoimmuni, ma anche dalle droghe quale *acido-tienic*, *il dihydralazine*, *il halothane*, *il phenytoin*, *il luminal*, *il carbamazepine* e tramite le infezioni epatiti C e D.⁴⁻⁶

Il gruppo autoimmune internazionale di epatite categorizza AIH in due gruppi separati di malattia: Tipo 1 e tipo 2. Questa distinzione è basata sulla presenza dei autoanticorpi dell'indicatore in siero dei pazienti affettati. Un tipo 1 AIH è caratterizzato dai autoanticorpi antinucleari (ANA) e dagli anticorpi del muscolo liscio (SMA)⁵. Il tipo 1 è il tipo più comune di AIH, la contabilità per 60-70% dei pazienti con AIH. Type 2 è una malattia piuttosto più rara (larga diffusione del tipo 2 di AIH è circa 10 casi per milione) caratterizzata dalla presenza dei autoanticorpi contro gli antigeni microsomi epatici e renali (LKM) e dall'assenza di ANA e di SMA³. 70% di questi pazienti sono giovani, vecchio 2 - 14 anni all'inizio. Le conseguenze di tipo 2 AIH sono severe: tipicamente, l'inizio acuto progredisce velocemente a guasto del fegato e di cirrosi.

Il antigene connesso con gli anticorpi LKM1 è anticorpi del citocromo P4502D6. Anticorpi a LKM1 si presenta principalmente in pazienti con AIH ma può anche essere rilevato in alcuni pazienti con l'infezione di HCV⁷⁻¹⁰. L'analisi di IMMCO anti-LKM1 usa l'antigene specifico per assicurare un alto grado della specificità per AIH.⁷⁻¹⁰

* prodotto sotto il brevetto # 5.830.067

PRINCIPIO DELLA METODICA

L'antigene LKM-1 è adsorbito sulla parete dei pozzetti di una piastra microtiter di polistirene. La piastra è ostruita per ridurre le reazioni di non-specifico. I controlli, I calibratori, i sieri diluiti dei pazienti vengono distribuiti nei pozzetti corrispondenti, consentendo agli anticorpi anti-LKM-1 eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito. L'eccesso di campione non legato viene allontanato mediante il lavaggio e successivamente si aggiunge a ciascun pozzetto un anticorpo anti-IgG umane marcato con un enzima. Questo l'enzima ha coniugato gli anticorpi si lega specificamente all'immunoglobulina umana del categoria IgG. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpi umane marcati con l'enzima, il substrato enzimatico specifico (pNPP) allora è aggiunto ai pozzetti. Dopo aver interrotto la produzione enzimatica del prodotto colorato si determina la presenza o l'assenza di anticorpi anti-LKM-1 confrontando la densità ottica del campione con quella di una curva di calibrazione standard a 4 punti. I risultati sono riportati in modo semi-quantitativo in unità ELISA (EU/ml).

REAGENTI

Condizioni di conservazione

Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

Non usare se il reagente non è chiaro.

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'acqua distillata o deionizzata per il volume del 1L.

Microstrips: Usare una volta soltanto.

Precauzioni

Tutte le fonti umane di materiali usati nella preparazione dei controlli per questo prodotto sono state testate e sono risultate negative per la presenza di anticorpi anti-HIV, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV mediante metodi approvati dall'FDA. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

La sodio azide è usata come conservante. La sodio azide è un veleno e può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Lasciar scorrere grandi quantità di acqua, se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, per prevenire la formazione di azidi.

La sostituzione di componenti diversi da quelli forniti nel kit può causare risultati non attendibili. Usare le buone tecniche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e chimica. Non usare dopo la data di scadenza.

Materiali forniti

IMMCO LKM-1 ELISA **REF** 1168

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	MICROPLATE LKM-1	microstrips da 96 pozzetti individuali con antigene LKM-1
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A LKM-1 *	calibratore A (protezione verde), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B LKM-1 *	calibratore B (protezione viola), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C LKM-1 *	calibratore C (protezione blu), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D LKM-1 *	calibratore D (protezione gialla), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + LKM-1 *	controllo positivo (protezione rossa), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	controllo negativo (protezione bianca), pronto al uso, contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	coniugato fos. alc. Colore rosa codificato colore.
1 x 60 ml	DIL *	diluyente per campioni. Colorare l'azzurro codificato.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzimatico. Contiene il pNPP. Proteggere da luce.
1 x 12 ml	STOP	soluzione bloccante
2	BUF WASH	tampone di lavaggio per 1 litro/fiala

* Contiene < 0.1% NaN₃

Materiali richiesti ma non forniti

- Micropipette in grado di erogare volume di 5 – 1000 µL
- Puntali monouso per micropipette
- Provette per la diluizione dei sieri, volume 4mL
- Acqua distillata o deionizzata
- Lettore per piastre ELISA in grado di leggere a 405nm
- Bottiglia per tampone di lavaggio
- Temporizzatore
- Carta assorbente

Raccolta dei campioni

Questa tecnica deve essere usata con un campione di siero. Campioni con segni di contaminazione microbica, trattati con calore o contenenti particelle visibili non dovrebbero essere usati. Si dovrebbe evitare anche l'uso di sieri fortemente emolizzati o lipemici.

Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 8 ore. Se il test non può essere eseguito entro 8 ore, conservare i campioni in frigorifero a 2-8°C. Se il test non può essere eseguito entro 48 ore, oppure per la spedizione dei campioni, congelare a -20°C. Evitare il congelamento ripetuto e lo scioglimento.

METODICA

Prima di incominciare

- Prima di cominciare l'analisi ha letto con attenzione queste istruzioni.
- Portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (20-26°C) per 30 minuti. Materiali di ritorno al frigorifero subito dopo di uso.
- Preparare tutte le diluizioni degli esemplari pazienti prima di iniziare la prova.
- **Rimettere immediatamente la strisce inutilizzate nella busta contenente il materiale essicante e sigillarla bene per minimizzare l'esposizione all'umidità ambientale.**
- Lavaggio: La buona tecnica è critica. Una rondella automatizzata del piastra microtiter ELISA è suggerita.
- Utilizzare una pipetta multicanale capace di trasporto delle 8 posizioni simultaneamente. Ciò accelera il processo e provvede ad un più tempo di incubazione dell'uniforme.
- La sincronizzazione attenta è importante. I periodi di incubazione cominciano dopo l'erogazione del reagentes.

Esecuzione del test

1. **TUTTI I REAGENTI DEVONO ESSERE PORTATI A TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C) PRIMA DI INIZIARE IL TEST.**
2. Usare l'annotazione di protocollo per notare la posizione degli esemplari nel piastra microtiter. È buona pratica del laboratorio verificare gli esemplari due volte.
3. **Determinazione qualitativa:** usare soltanto Calibratore D.
Determinazione semi-quantitativa: usare Calibratori A - D come indicato nell'esempio qui sotto.

Determinazione qualitativa:

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

Determinazione semi-quantitativa:

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. Preparare una diluzione di **1:101** dei campioni mescolando **5 µl** dei campioni con **0.5 ml** di diluente per campioni.
 5. Distribuire 100 µL di ciascuno dei calibratori, dei campioni diluiti, del Controllo Negativo e del Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti.
- Nota:** Includere una posizione con **100 µl** del diluente per campioni come spazio in bianco del reagente. Il valore zero del lettore del piastra microtiter dovrebbe essere regolato usando questa posizione.
6. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente su una superficie piana.
 7. Lavaggio: Aspirare completamente il contenuto di ciascun pozzetto. Distribuire 200-300µL di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti e quindi aspirarla. Ripetere questa operazione per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Dopo l'ultimo lavaggio capovolgere la piastra e scuoterla fermamente su tovaglioli di carta assorbente per rimuovere eventuali residui di liquido. Non asciugarsi pozzetti completamente.
 8. Distribuire 100µL di Coniugato in ciascun pozzetto.
 9. Incubare i pozzetti per 30 minuti.
 10. Lavaggio: Ripetere la procedura descritta al punto 7.
 11. Distribuire 100µL di substrato enzimatico in ciascun pozzetto
 12. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
 13. Distribuire 100µL di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Per l'aggiunta della soluzione bloccante mantenere la stessa sequenza e gli stessi tempi utilizzati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza (OD) entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.
 14. Leggere l'assorbanza (OD) di ciascun pozzetto a 405nm usando un singolo o lettore doppio del piastra microtiter di lunghezza d'onda contro l'insieme in bianco del reagente alla capacità di assorbimento zero.

RISULTATI

Calcolo dei risultati

Le concentrazioni dei campioni pazienti possono essere determinate da uno di due metodi:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA

OD di Esemplare

$$\frac{\text{OD di Esemplare}}{\text{OD di Calibratore D}} \times \text{EU/ml de Calibratore D} = \text{EU/ml di Esemplare}$$

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Capacità di assorbimento del diagramma di calibratores da A a D contro la loro concentrazione rispettiva su una carta da grafico lineare-lineare. Tracciare la concentrazione EU/ml sull'X-asse contro la capacità di assorbimento sull'Y-asse e disegnare la curva adatta migliore. Determinare le concentrazioni dei campioni pazienti dalla curva contro il relativo valore corrispondente di capacità di assorbanza.

Calibratore

I calibratori sono inclusi per fornire semi - la quantificazione e devono essere usati con ogni prova. Gli esemplari pazienti che contengono i livelli elevati dell'anticorpo possono dare i valori di capacità di assorbanza più grandi di quello del calibratore A. Per che determina i valori semiquantitativi esatti tali esemplari dovrebbe più ulteriormente essere diluito in modo da fanno parte della gamma della curva del calibratore una volta riprovati. Per determinazione EU/ml, moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Le seguenti informazioni servono soltanto da guida nell'interpretazione dei risultati del laboratorio. Ogni laboratorio deve determinare i relativi propri valori normali.

anti-LKM1	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminato
>25 EU/ml	Positivo

LIMITAZIONI

I risultati ottenuti servono soltanto come un sussidio nella diagnosi del tipo 2 di AIH e non dovrebbero essere interpretati come diagnostico in se stesso. Il siero del tipo 2 pazienti di qualche AIH può essere negativo per gli anticorpi anti-LKM1.

VALORI PREVISTI

Non ci è sensibile e l'indicatore specifico per AIH. Diagnosis è fatto da una combinazione delle caratteristiche cliniche, biochimiche, sierologiche ed istologiche. La presenza di una varietà di aiuti dei autoanticorpi nell'identificazione e nella diagnosi di AIH. Sul tipo di anticorpi presenti, AIH può essere divisa nei sottotipi. I autoanticorpi a LKM1 sono indicatori specifici di tipo 2 AIH (vedere le tabelle 1 e 2 all'estremità di questo documento).

Precisione

Due sieri positivi LKM1 sono stati esaminati con il IMMCO LKM1 per determinare la variabilità di intra-analisi ed inter. Vedere la tabella 3 all'estremità di questo documento.

Recupero

I campioni con le concentrazioni conosciute LKM1 sono stati mescolati con le diluzioni adatte di un altro campione positivo con gli importi conosciuti di LKM1. LKM1 che i livelli dei campioni mescolari sono stati determinati e dai valori ha ottenuto il recupero di percento calcolato. Vedere la tabella 4 all'estremità di questo documento.



Anti-LKM1 ELISA*

IVD

REF 1168

96 Determinations

ImmLiSa™ anti-LKM1 é um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção e semi-quantificação de anticorpos anti- microssômico fígado/rim no soro humano, por ajuda no diagnóstico de hepatite auto-imune.

SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

O hepatite autoimune (AIH) é uma doença de fígado inflamatório crônica distinta, caracterizada pelo ataque do sistema imune dirigido de encontro aos antígenos do “proprio”, especial aqueles expressados no fígado ^{1,2}. Ocorre em ambos os sexos e todos os grupos de idade, entretanto, mulheres são umas vítimas mais prováveis de AIH do que homens. Nas mulheres, 70% de caixas diagnosticadas de AIH ocorrem entre as idades de 15 e de 40. ¹⁻⁴

O hepatomegalie e o splenomegalie são os descobrimentos patológicos os mais comuns associados com o AIH. Anormalidades do sistema imune que marcam AIH incluem anticorpos aos antígenos do fígado, *hyper-gammaglobulinemia*, e uma relação CD4/CD8 aumentada no sangue periférico e no fígado. Os anticorpos microssômico do fígado/rim (LKM1) podem ser induzidos não somente por mecanismos autoimune, mas também por drogas tais como o *ácido tienic, dihydralazine, halothane, phenytoin, phenobarbital, carbamazepine* e por infecções de hepatite C e D. ⁴⁻⁶

O grupo autoimune internacional do hepatite categoriza AIH em dois grupos separados da doença: Tipo 1 e tipo 2. Esta distinção é baseada na presença de autoanticorpos do marcador no soro de pacientes afetados. O tipo 1 de AIH é caracterizado por autoanticorpos antinuclear (ANA) e por anticorpos do músculo liso (SMA) ⁵. O tipo 1 é o tipo mais comum de AIH, a contabilidade para 60-70% dos pacientes com AIH. Tipo 2 é uma doença um tanto mais rara (o prevalência do tipo 2 de AIH é aproximadamente 10 casos por milhão) caracterizada pela presença dos autoanticorpos de encontro aos antígenos microssômico do fígado/rim (LKM) e pela ausência de ANA e de SMA ³. 70% destes pacientes são novos, 2 a 14 anos velho no início. As conseqüências do tipo 2 AIH são severas: tipicamente, o início agudo progride rapidamente à falha do cirrose e do fígado.

O antígeno associado com os anticorpos LKM1 é anticorpos do cytochrome P4502D6. Anticorpos a LKM1 ocorre predominante nos pacientes com AIH mas pode também ser detectado em alguns pacientes com infecção de HCV⁷⁻¹⁰. O análise de IMMCO anti-LKM1 usa o antígeno específico assegurar um grau elevado do especificação para AIH. ⁷⁻¹⁰

* *manufaturado sob a patente # 5.830.067*

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os poços da microplaca de poliestireno, encontram-se revestidos com antígenos de LKM-1. A placa é obstruída para reduzir o emperramento não é específica. Os controles, calibradores e as amostras diluídas são pipetados nos diferentes poços, permitindo que os anticorpos específicos anti-LKM-1 presentes se liguem ao antígeno imobilizado. Depois de proceder à lavagem dos poços, para retirar a amostra não ligada, adiciona-se o conjugado IgG anti humano marcado. Estes anticorpos ligam especificamente ao imunoglobulin humano da classe IgG. Depois da segunda lavagem, para retirar o excesso de conjugado, adiciona-se o substrato (pNPP) que provoca uma alteração da cor na presença do Conjugado. Após adição da solução de paragem a presença ou ausência de anticorpos anti-LKM-1 é determinada por comparação da densidade óptica da amostra com a densidade óptica dos

4 pontos da curva de calibração. Os resultados são apresentados semi-quantitativamente em unidades ELISA (EU/ml).

COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO

Precauções particulares de conservação

Conservar todos os reagentes a 2-8° C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.

Não usar se o reagente não estiver desobstruído.

Tampão de lavagem: Adicionar a água destilada ou deionizada para o volume do 1L.

Micropoços: Usar uma vez somente.

Precauções

Todo o material de origem humana, utilizado na preparação dos controlos para este produto foi testado e deu resultados negativos para testes aprovados pela FDA em relação a anticorpos anti HBs Ag, HIV e HCV. Contudo nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência destes anticorpos ou outros agentes infecciosos. Assim os controlos e calibradores devem ser manipulados como material potencialmente infectante.

A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é considerado venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. Pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão ao deitarmos fora os restos de reagentes devemos deixar correr água em quantidade suficiente para evitar a formação destas substâncias.

A Substituição de componentes do dispositivo pode originar resultados inconsistentes.

Usar técnicas de laboratório boas minimizar a contaminação microbial e química.

Não usar após a data de expiração.

Material fornecido

IMMCO LKM-1 ELISA **REF** 1168

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 96 determinações cada uma.

12 x 8	MICROPLATE LKM-1	96 micropoços partilhada, LKM-1
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A LKM-1 *	calibrador A (<i>tampão verde</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B LKM-1 *	calibrador B (<i>tampão violeta</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C LKM-1 *	calibrador C (<i>tampão azul</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D LKM-1 *	calibrador D (<i>tampão amarelo</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL + LKM-1 *	controle positivo (<i>tampão vermelho</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	controle negativo (<i>tampão branco</i>), pronto para uso. Contem soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	conjugado fos. alc. Cor-de-rosa codificada cor.
1 x 60 ml	DIL *	diluyente de amostras. Azul codificado cor.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	substrato enzime. Contem pNPP. Proteger da luz.

1 x 12 ml **STOP**

solução de parada

2 **BUF WASH**

tampão de lavagem do 1 litro/viale

* Contem < 0.1% NaN₃

Material necessário não fornecido com o kit

- Micropipetas de 5 - 1000 µl
- Pontas descartáveis para as micropipetas
- Tubos para diluições de 4 ml de volume
- Água destilada ou desionizada
- Fotometro para leitura de microplaca, com filtro de 405 nm
- Frasco para tampão de lavagem
- Temporizador
- Papel absorvente

Colheita da Amostra

Este procedimento deve ser efectuado com soro. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras hemolizadas ou lipémicas devem ser evitadas.

Armazenar as amostras à temperatura ambiente apenas durante 8 horas. Se o teste não for efectuado em 8 horas, guardar as amostras a 2-8°C. Se o teste não for efectuado em 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20°C ou a temperatura inferior. Evitar congelar-se e aquecer-se repetidos.

MÉTODO

Antes de Iniciar

- Antes de começar o teste leu estas instruções com cuidado.
- Todos os componentes devem encontrar-se à temperatura ambiente (20-26°C) por 30 minutos antes de usar. Materiais do retorno ao refrigerador imediatamente depois do uso.
- Preparar todas as diluições dos espécimes pacientes antes de começar o teste.
- **Guardar imediatamente as restantes estripes na saqueta e selar convenientemente para minimizar a exposição ao vapor de água.**
- Lavagem: A técnica boa é crítica. Uma arruela automatizada do microplaca é recomendada.
- Usar uma pipeta capaz de entregar 8 posições simultaneamente. Isto apressa o processo e fornece-o por um tempo mais uniforme.
- O sincronismo cuidadoso é importante. Os períodos das incubações começam após ter dispensado líquidos.

Técnica

1. **ANTES DE INICIAR TODOS OS COMPONENTES DEVEM ENCONTRAR-SE À TEMPERATURA AMBIENTE (20-26°C).**
2. Usar o registro do protocolo anotar a posição dos espécimes no microplaca. É prática boa do laboratório testar espécimes na duplicata.
3. **Determinação qualitativa:** usar somente Calibrador D.
Determinação semi-quantitativa: usar Calibradores A - D como mostrado no exemplo abaixo.

Determinação qualitativa:**Determinação semi-quantitativa:**

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

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

- Preparar uma diluição de **1:101** do espécime paciente misturando **5 µl** do espécime paciente com **0.5 ml** de diluente de amostras.
 - Pipetar 100 µl de cada um dos calibradores, das amostras diluídas, do controlo negativo e do controlo positivo para os poços.
- Nota:** Incluir uma posição com **100 µl** do diluente de amostras como um espaço em branco. O valor zero do leitor do microplaca deve ser ajustado usando esta posição.
- Incubar durante 30 minutos á temperatura ambiente.
 - Lavagem: Aspirar os pocitos. Adicionar 200-300 µl de tampão e aspirar novamente. Repetir esta sequencia mais 3 vezes num total de 4 lavagens. Após a ultima lavagem, inverter a placa em papel absorvente para retirar todo o liquido residual. Não secar micropoços completamente.
 - Pipetar 100 µl do conjugado em cada pocito.
 - Incubar os poços durante 30 minutos á temperatura ambiente.
 - Lavagem: Repetir o ponto 7.
 - Dispensar 100 µl do substrato enzime em cada pocito.
 - Incubar durante 30 min, e á temperatura ambiente.
 - Adicionar 100 µl de solução de parada em cada pocito. Manter a mesma sequência para a adição da solução de parada, conforme a sequência anteriormente utilizada para a adição do substrato enzime. Ler a densidade optica (DO) no espaço de 1 hora após para a reacção.
 - Ler a densidade optica (DO) a 405 nm no espaço usando um único ou leitor duplo do microplaca de encontro ao jogo em branco do reagente no absorvância zero.

RESULTADOS**Cálculo dos resultados**

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

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA**DO Espécime**

$$\frac{\text{DO Espécime}}{\text{DO Calibradore D}} \times \text{EU/ml Calibradore D} = \text{EU/ml Espécime}$$
2. DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

A absorvância do lote de Calibradore A a D de encontro a sua concentração respectiva em um papel de gráfico linear-linear. Traçar a concentração EU/ml na X-linha central de encontro ao absorvância na Y-linha central e extrair a mais melhor curva apta. Determinar as concentrações das amostras pacientes da curva de calibradores a seu valor correspondente do absorvância.

Calibrador

Os calibradores são incluídos para fornecer semi-quantitativa e devem ser usados com cada teste. Os espécimes pacientes que contêm uns níveis mais elevados do anticorpos podem dar os valores do absorvância mais grandes do que aquele do Calibradore A. Para que determina valores semi-quantitativa exatos tais espécimes deve mais ser diluído assim que caem dentro da escala da curva do calibrador quando reexaminados. Para determinando EU/ml, multiplicar as unidades obtidas pelo fator da diluição.

Interpretação

A seguinte informação serve somente como uma guia na interpretação dos resultados do laboratório. Cada laboratório deve determinar seus próprios valores normais.

anti-LKM1	Interpretação
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminado
>25 EU/ml	Positivo

LIMITAÇÕES

Os resultados obtidos servem somente como um ajuda no diagnóstico do tipo 2 de AIH e não devem ser interpretados como o diagnóstico uso. O soro do tipo 2 pacientes de algum AIH pode ser negativo para os anticorpos anti-LKM1.

VALORES PREVISTOS

Não há nenhum sensível e o marcador específico para AIH. Diagnóstico é feito de uma combinação de características clínicas, bioquímico, serológico e histológico. A presença de uma variedade de ajudas dos autoanticorpos na identificação e no diagnóstico de AIH. No tipo dos anticorpos atuais, AIH pode ser dividida em sub-tipos. Os autoanticorpos a LKM1 são indicadores específicos do tipo 2 AIH (ver as tabelas 1 e 2 na extremidade deste original).

Precisão

Dois soro LKM1 positivos foram testados com o IMMCO LKM1 para determinar o variação inter- e do intra- análise. Ver a tabela 3 na extremidade deste original.

Recuperação

As amostras com concentrações LKM1 sabidas foram misturadas com as diluições apropriadas de uma outra amostra positiva com quantidades conhecidas de LKM1. LKM1 que os níveis das amostras misturadas foram determinados e dos valores obteve a recuperação dos por cento calculada. Ver a tabela 4 na extremidade deste original.

REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

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-liver-kidney 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

Standard Curve/Courbe d'étalonnage/Curva standard/
Curva estándar/Standardkurve/Curva padrão
IMMCO Anti-LKM-1

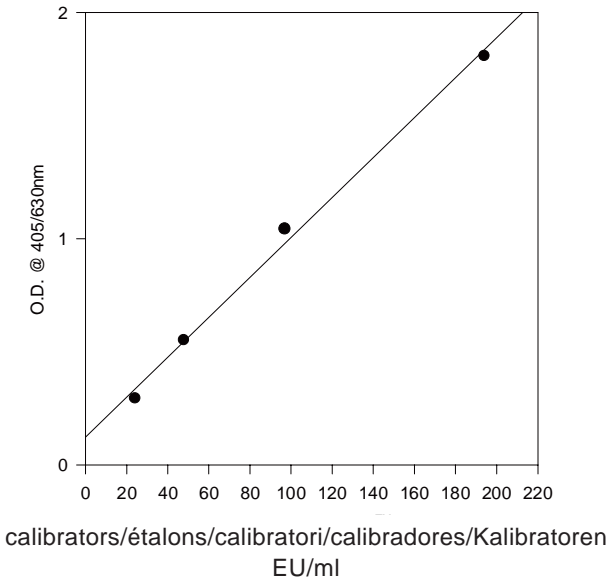


Table 1. Antibodies in Autoimmune Hepatitis

Antibodies in Autoimmune Hepatitis

Type of Antibody	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 %CV	intra-assay %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@immcodiagnostics.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