



IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 38084 LKM1 ELISA 96 Tests

Menarini™ 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^{1,2}. 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 ans¹⁻⁴.

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 D⁴⁻⁶.

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 affectés⁵. 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 SMA³. 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 P450D6. Les anticorps au LKM1 se retrouvent principalement chez des patients souffrant d'AIH mais peuvent également être détectés chez certains patients souffrant d'infection HCV⁷⁻¹⁰. Le kit Menarini™ anti-LKM1 utilise un antigène spécifique pour assurer une spécificité élevée pour l'AIH⁷⁻¹⁰.

**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'usage¹⁷.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). 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

Menarini™ LKM1 ELISA [REF] 38084

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.


 1 x 12 ml IgG-CONJ ALKPHOS *

Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines. Prêt à l'emploi.
Code couleur rose.

 1 x 60 ml DIL *

Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.

 1 x 12 ml SUBSTRATE *

Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP.
Protéger de la lumière.

 1 x 12 ml STOP

Solution d'arrêt prête à l'emploi.

 2 x BUF WASH

Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/
flacon.

* Contient < 0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

LOT Numéro de lot

REF Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

IVD 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.

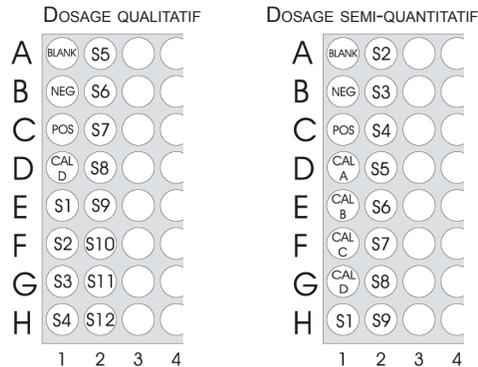
METHODE

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.



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.



Valeurs anti-LKM1	Interprétation
<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 Menarini™ 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.



REFERENCES • BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ • 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

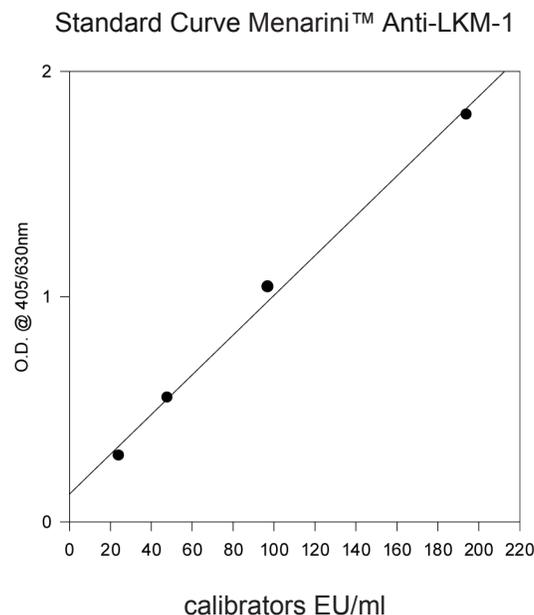




Table 1. Antibodies in Autoimmune Hepatitis

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



 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**
via Sette Santi 3
50131 Firenze
Italia

EL

Διανέμεται στην
ΕΛΛΑΔΑ από την
A. Menarini Diagnostics S.A.
575, Vouliagmenis Ave.
16451 Argyroupolis
Attiki

AT

ÖSTERREICH
Vertrieb durch
A. Menarini Ges.m.b.H
Pottendorfer Straße, 25/27
A - 1120 Wien

BE

BELGIQUE
Distribué par
A. Menarini Diagnostics
Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4
1930 Zaventem

PT

PORTUGAL
Distribuido por
A. Menarini Diagnósticos, Lda
Quinta da Fonte
Edifício D.Manuel I, 2ºB
2770-203 Paço de Arcos

NL

NEDERLAND
Distributed by
A. Menarini Diagnostics
Benelux N.V.
De Haak, 8
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007
Data de publicação: Março de 2007
Ausgabedatum: März 2007
Date d'émission : Mars 2007
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4168 CE M

