

## QUY TRÌNH

### N.527. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG TIỂU VI THỂ GAN THẬN TYPE 1 (LKM1)

#### I. NGUYÊN LÝ

Xét nghiệm dựa trên phản ứng miễn dịch gắn enzyme gián tiếp theo các bước sau:

Các kháng thể có mặt trong mẫu dương tính gắn với kháng nguyên phủ trên bề mặt của hai giếng phản ứng, hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Sau khi ủ, bước rửa đầu tiên sẽ loại bỏ các phân tử không gắn và gắn không đặc hiệu. Tiếp đó, chất cộng hợp enzyme được bổ sung sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên - kháng thể đã được cố định. Sau khi ủ, bước rửa thứ hai sẽ loại bỏ chất cộng hợp không gắn. Cơ chất enzyme tiếp tục được thêm vào giếng, quá trình thủy phân và tạo màu diễn ra trong thời gian ủ. Cường độ màu xanh dương tạo ra tỉ lệ thuận với nồng độ của phức hợp kháng nguyên-kháng thể và có thể đo bằng phương pháp quang học ở bước sóng 650 nm trên hệ thống xét nghiệm miễn dịch ELISA (Enzymelinked immunosorbant assay)

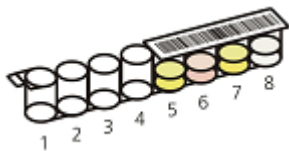
#### II. CHUẨN BỊ

**1. Cán bộ thực hiện:** 01 bác sĩ hoặc 01 cán bộ đại học và 01 kỹ thuật viên chuyên ngành Hóa sinh.

**2. Phương tiện, hóa chất:**

- Phương tiện: máy xét nghiệm miễn dịch Alegria- hãng ORGENTEC/ Germany.
- Thuốc thử sẵn sàng sử dụng: Bộ xét nghiệm định lượng LKM1 như sau:

Dải Alegria Test Strips được cấu thành từ 8 giếng với các thành phần:



- |             |   |
|-------------|---|
| Giếng 1 + 2 | Giếng trống và không phủ (để pha loãng mẫu)   |
| Giếng 3 + 4 | Được phủ kháng nguyên (giếng phản ứng)  |
| Giếng 5     | Mẫu chứng, màu vàng, chứa kháng thể đặc hiệu, PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản natri azide 0,09% và ProClin 300 0,05%.         |
| Giếng 6     | Chất cộng hợp enzyme, màu đỏ nhạt, chứa kháng thể kháng IgG người gắn HRP; PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản ProClin 300 0,05%. |

Giếng 7	Dung dịch pha loãng mẫu, màu vàng, chứa PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản natri azide 0,09% và ProClin 300 0,05%.
Giếng 8	Cơ chất TMB, trong suốt, chứa 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin

Các vi giếng được phủ sẵn Clq người có độ tinh khiết cao.

Mã sản xuất trên mã vạch : LKM-1

- Ngoài ra còn dung dịch hệ thống như:

+ Wash (1x20mL): Dung dịch rửa, chứa TRIS, detergent, chất bảo quản natri azide 0,09% (50x)

+ System fluid (1x2,5mL): Dung dịch hệ thống chứa acid (1000x).

- Bộ xét nghiệm cần được bảo quản trong bóng tối ở điều kiện 2-8°C. Không để hóa chất tiếp xúc với nhiệt, mặt trời hoặc ánh sáng mạnh trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng. Bảo quản thanh thử Alegria (đậy kín và khô ráo) trong túi có khóa được cung cấp. Dung dịch Wash Buffer và System Fluid sau khi pha loãng ổn định trong tối thiểu 30 ngày khi được bảo quản ở 2-8°C.

Dụng cụ khác: + Máy vortex; Pipet 10 µL;

+ Ống đong thể tích 1000 mL và 2500 mL

+ Nước cất hoặc nước khử ion

**3. Người bệnh:** Người bệnh được giải thích và tư vấn trước khi thực hiện XN, tốt nhất là nhịn ăn sáng và lấy máu vào buổi sáng.

**4. Phiếu xét nghiệm:** có đầy đủ thông tin về bệnh nhân bao gồm họ tên, tuổi, khoa phòng, chẩn đoán, tình trạng mẫu, tên BS chỉ định, ngày giờ chỉ định, ngày giờ lấy mẫu, các loại thuốc đã sử dụng (nếu có)...

### III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

#### 1. Lấy mẫu bệnh phẩm và xử lý mẫu:

- Bệnh phẩm phải được lấy đúng kỹ thuật vào ống xét nghiệm tiêu chuẩn. Sử dụng ống không chống đông (ống serum) hoặc sử dụng ống có chất chống đông Li-Heparine, EDTA.

- Bệnh phẩm được nhận từ các khoa lâm sàng và bộ phận lấy mẫu phòng khám. Nhân viên nhận mẫu lấy thông tin bệnh nhân từ phần mềm quản lý Bệnh viện, in và dán barcode vào ống bệnh phẩm, sau đó cho ly tâm 4000 vòng trong 5 phút trước khi tiến hành kỹ thuật.

- Bệnh phẩm có thể được lưu ở 2-8°C trong vòng 5 ngày hoặc -20°C trong vòng 6 tháng.
- Bảo quản chất chuẩn, QC sau khi hoàn nguyên ở nhiệt độ -20°C, khi tiến hành chạy phải để ở nhiệt độ phòng (20- 25°C) cho đến khi rã đông hoàn toàn và lắc đều trước khi tiến hành xét nghiệm.

## **2. Tiến hành kỹ thuật**

- Máy xét nghiệm, hóa chất đã được chuẩn trước khi thực hiện phân tích. Việc chuẩn xét nghiệm định lượng LKM1 hiệu chuẩn mỗi khi thay đổi lô hóa chất. Kiểm tra chất lượng nằm trong giới hạn cho phép. Thông thường chạy nội kiểm (QC) 2 mức mỗi ngày: mức bình thường và không bình thường. Đối chiếu với luật về kiểm tra chất lượng nếu đạt thì tiến hành phân tích mẫu.

- Thanh thử Alegria Test Strips với công nghệ SMC được sử dụng với thiết bị chẩn đoán Alegria. Để có thông tin chi tiết về quy trình vận hành thiết bị, tham khảo tài liệu hướng dẫn sử dụng thiết bị.

(1) Bóc miếng dán phủ các giếng trống từ 1 đến 4 trên thanh thử Alegria Test Strips. Không bóc phần dán phủ có in mã vạch, phủ các giếng từ 5 đến 8.

(2) Hút 10 µL mẫu không pha loãng vào đáy giếng 1.

(3) Đặt thanh thử vào khay SysTray.

(4) Đặt các khay SysTray vào đúng vị trí trên thiết bị Alegria và bắt đầu chạy. Tất cả các bước sau đó sẽ được thực hiện tự động. Xét nghiệm chạy hoàn tất khi thiết bị bắt đầu in kết quả.

- Định kỳ: Chuẩn lại và chạy 2 mức QC sau khi thay lô thuốc thử mới hoặc sau khi bảo dưỡng, sửa chữa máy do sự cố, thay thế trang thiết bị phân tích quan trọng. Ghi lại kết quả vào bảng theo dõi kết quả chuẩn máy xét nghiệm.

- Đưa bệnh phẩm vào phân tích theo protocol của máy. Khi có kết quả thì phân tích và đối chiếu với phiếu xét nghiệm, trả, lưu kết quả vào hệ thống mạng, in phiếu kết quả xét nghiệm và trả kết quả cho người bệnh đúng thời gian quy định.

## **IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

**1. Giá trị tham chiếu:** Bình thường: LKM1: <10 U/mL

### **2. Ý nghĩa lâm sàng**

Việc phát hiện các tự kháng thể đóng vai trò then chốt trong chẩn đoán các rối loạn ở gan, như viêm gan tự miễn (AIH), xơ gan mật nguyên phát (PBC), và các biến chứng của viêm xơ chai đường mật ở người lớn và trẻ em. Các kháng thể kháng cơ trơn (ASMA), kháng thể kháng nhân (ANA) và kháng thể kháng microsoma gan-thận (anti-LKM -1) xác định AIH type 1 và 2 và cũng có thể xuất hiện trong giai đoạn tiềm tàng của viêm gan tự miễn sau ghép gan. Các kháng thể kháng ty thể (AMA) là biểu hiện của PBC. ANA, ASMA, kháng thể kháng LKM1 và AMA

nên được xác định ở tất cả các bệnh nhân nghi ngờ bệnh gan tự miễn. Sự theo dõi các tự kháng thể có thể hữu ích trong trường hợp AIH mà có sự biến mất hoặc giảm mạnh ANA, ASMA và kháng thể kháng LKM1 có thể là một chỉ số cho thấy đáp ứng với điều trị bằng ức chế miễn dịch. Viêm gan tự miễn (AIH) là bệnh viêm gan chủ yếu ảnh hưởng tới giới nữ, đặc trưng bởi viêm gan gian thùy, tăng nồng độ enzyme transaminase, sự có mặt của các tự kháng thể trong huyết thanh và sự gia tăng nồng độ của IgG. AIH đáp ứng với điều trị ức chế miễn dịch, do đó cần đưa ra phác đồ điều trị sớm ngay khi chẩn đoán ra.

Bệnh viêm gan tự miễn (AIH) type 1 ảnh hưởng chủ yếu ở người trưởng thành, trong khi đó AIH type 2 có 80% trường hợp là gặp trên trẻ em. Phản ứng huyết thanh dương tính với ANA và/ hoặc ASMA xác định AIH type 1, dương tính với kháng thể kháng micrososome gan thận type 1 (LKM-1) và/ hoặc kháng thể kháng tế bào chất của gan type 1 (anti-LC1) xác định AIH type 2. Bệnh nhân bị AIH type 2 có kháng thể kháng LC1 có đặc điểm mô bệnh học nặng hơn so với các trường hợp không có kháng thể kháng LC1. Các kháng thể kháng LKM-1 gắn với cytochrome P450 IID6 (CYP2D6); enzyme formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) là phân tử đích của các kháng thể kháng LC1.

Tự kháng thể kháng kháng nguyên gan hòa tan (SLA) và kháng nguyên gan-tụy (LP), cùng gắn với phân tử ức chế UGA tRNA liên kết với Protein kháng nguyên (tRNP(Ser)Sec). Chúng cũng được gọi là tự kháng thể kháng SLA/LP và được dùng như là những marker đặc hiệu cho type 3 của trường hợp AIH trầm trọng nhưng kết quả huyết thanh học âm tính đối với các tự kháng thể AIH thông thường. Những điểm tương đồng về mặt lâm sàng giữa các bệnh nhân AIH type 1 (dương tính với ANA hoặc ASMA) và bệnh nhân AIH chỉ dương tính với anti-SLA với khoảng 30% huyết thanh dương tính trùng lặp giữa anti-SLA và ASMA và/ hoặc ANA, cho thấy rằng kháng thể kháng SLA là một marker quan trọng bổ sung cho chẩn đoán AIH type 1, hơn là marker của AIH type 3 đơn thuần. Sự xuất hiện của kháng thể kháng SLA trên những bệnh nhân mắc AIH nặng chỉ điểm xu hướng tái phát sau khi ngưng sử dụng corticosteroid so với những trường hợp tương tự nhưng âm tính với kháng thể kháng SLA.

Xơ gan mật nguyên phát (PBC) được xác định bởi các kháng thể kháng ty thể (AMA-M2) phản ứng với các enzyme của phức hợp pyruvate dehydrogenase tiểu đơn vị E2 và ANA đặc hiệu bệnh chủ yếu là phản ứng với kháng nguyên lõi nhân gp210 và kháng nguyên khối nhân sp100. Chúng đặc biệt quan trọng trong PBC có AMA-M2 âm tính.

Viêm xơ hóa đường mật thể hiện ở ít nhất hai thể, thể đầu tiên là xơ hóa đường mật nguyên phát (PSC) chủ yếu ảnh hưởng đến nam giới trưởng thành trong đó chỉ có phản ứng duy nhất (không đặc hiệu) là một kháng thể kháng bào tương quanh nhân bạch cầu trung tính không điển hình (p-ANCA) và thể thứ hai là bệnh phát triển từ thời thơ ấu được gọi là bệnh xơ hóa đường mật tự miễn (ASC) với những đặc điểm huyết thanh học gần giống với AIH type 1.

Nhiễm virus viêm gan C (HCV) có một số mối liên hệ quan trọng với bệnh viêm gan tự miễn. Những bệnh nhân có phản ứng huyết thanh dương tính với kháng thể kháng micrososome

gan-thận type 1 (LKM-1) thường bị nhiễm HCV (9). Kháng thể LC1 đầu tiên được miêu tả kết hợp với kháng thể kháng LKM-1 hoặc miêu tả riêng biệt trong bệnh nhân AIH type 2. (17) Kháng thể kháng LC1 cũng đã được tìm thấy ở 14% bệnh nhân bị viêm gan C có kháng thể kháng LKM-1 dương tính.

Viêm gan tự miễn không rõ nguồn gốc được đặc trưng bởi hình ảnh lâm sàng mà không thể phân biệt được với bệnh viêm gan tự miễn. ANA, ASMA và kháng thể kháng LKM-1 cho kết quả âm tính khi bệnh bắt đầu khởi phát và có thể xuất hiện muộn hơn trong quá trình tiến triển bệnh. Kháng thể kháng SLA có thể dương tính trong 12-30% trường hợp bệnh nhân viêm gan chưa rõ nguyên nhân. Bệnh này thường đáp ứng với liệu pháp dùng steroid. Protein loại 1 mang tính kháng nguyên được tái tổ hợp với độ tinh sạch cao của microsomes gan-thận (LKM-1) được gắn vào các giếng.

## **V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Sử dụng bệnh phẩm máu toàn phần thu thập bằng các kỹ thuật được phê duyệt, tránh gây vỡ hồng cầu.

Mẫu huyết thanh dùng cho xét nghiệm phải trong và không bị vỡ hồng cầu. Tránh sử dụng các mẫu vỡ hồng cầu hoặc mẫu nhiễm mỡ, tuy nhiên, các mẫu này không gây nhiễu xét nghiệm.

Tránh lặp lại bước làm đông và rã đông mẫu huyết thanh hoặc huyết tương do có thể làm giảm hoạt tính của kháng thể.

Không khuyến cáo thực hiện xét nghiệm với mẫu huyết thanh đã bị bất hoạt bởi nhiệt.