



Instructions for Use

Anti-LKM-1 ELISA

IVD



REF EIA-4277



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Por favor, use apenas a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.
Folosîți doar manualul de instrucțiuni conținut în setul de testare

1	INTENDED USE EN	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	PATIENT SAMPLES	4
4	TEST COMPONENTS	4
5	ASSAY PROCEDURE	5
6	DATA PROCESSING	6
7	REFERENCE VALUES	7
8	CHARACTERISTIC ASSAY DATA	7
9	SAFETY PRECAUTIONS	8

1	ANWENDUNG DE	9
2	TESTPRINZIP	9
3	PATIENTENPROBEN	10
4	TESTKOMPONENTEN	10
5	TESTDURCHFÜHRUNG	11
6	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
7	REFERENZWERTE	13
8	TESTCHARAKTERISTIKA	13
9	ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	14

1	DESTINAZIONE D'USO IT	15
2	PRINCIPIO DEL SAGGIO	15
3	CAMPIONI DAI PAZIENTI	16
4	COMPONENTI DEL SAGGIO	16
5	ESEGUIMENTO DEL TEST	17
6	CALCOLO DEI RISULTATI	18
7	VALORI DI RIFERIMENTO	19
8	CARATTERISTICHE DEL TEST	19
9	NOTE GENERALI E PRECAUZIONI	20

1	INDICACION DE USO ES	21
2	PRINCIPIO DEL TEST	21
3	MUESTRAS DE PACIENTES	22
4	COMPONENTES DEL TEST	22
5	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	23
6	PROCESAMIENTO DE DATOS	24
7	VALORES DE REFERENCIA	25
8	DATOS CARACTERISTICOS DEL ENSAYO	25
9	PRECAUCIONES DE SEGURIDAD	26

1	INTRODUCTION FR	27
2	PRINCIPE DU TEST	27
3	ECHANTILLONS DES PATIENTS	28
4	COMPOSITION	28
5	PROTOCOLE DE DOSAGE	29
6	CALCUL DES RÉSULTATS	30
7	VALEURS DE REFERENCE	31
8	DONNEES ANALYTIQUES	31
9	PRECAUTIONS D'EMPLOI	32

1	UTILIZAÇÃO PREVISTA PT	33
2	PRINCÍPIO DO TESTE	33
3	AMOSTRAS DE DOENTES	34
4	COMPONENTES DO TESTE	34
5	EXECUÇÃO DO TESTE	35
6	CÁLCULO DOS RESULTADOS	36
7	VALORES DE REFERÊNCIA	37
8	CARACTERÍSTICAS DO TESTE	37
9	INFORMAÇÕES GERAIS E MEDIDAS DE PRECAUÇÃO	38

1	UTILIZARE RO	39
2	PRINCIPIUL TESTULUI	39
3	PROBE PACIENȚI	40
4	COMPONENTE TEST	40
5	EXECUTAREA TESTULUI	41
6	CALCULUL REZULTATULUI	42
7	VALORI DE REFERINȚĂ	43
8	CARACTERISTICILE TESTULUI	43
9	INDICAȚII GENERALE ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE	44

	SYMBOLS USED	45
--	--------------	----

1 INTENDED USE

Anti-LKM-1 is used for the quantitative determination of IgG antibodies to cytochrome P450 IID6 in human serum or plasma for the diagnosis of autoimmune hepatitis (AIH).

The group of primary autoimmune liver disease (PAL) comprises AIH, primary biliary cirrhosis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC).

The clinical picture of PAL is in most cases not different from other chronic liver diseases. About 15% of all cases with chronic liver diseases show an autoimmune pathogenesis. Therefore, after exclusion of infectious etiology especially by viruses, the determination of different autoantibodies is recommended.

Patients suffering from AIH show a variety of autoantibodies. Due to the appearance of different antibody specificities classification of AIH into different subgroups is discussed. Type I is characterized by the occurrence of antinuclear antibodies (ANA) and antibodies to smooth muscles (ASMA). ASMA recognize antigenic structure formed by polymeric f-Actin. For type II a high prevalence of antibodies to liver and kidney microsomal antigens (LKM) has been described. LKM1 antibodies recognize epitopes of cytochrome P450 IID6, a 50 kDa cytoplasmic protein found in hepatocytes and proximal tubular kidney cells. LC1 antibodies are specific for type II hepatitis, too. The respective antigen is formiminotransferase / cyclodeaminase located in the cytosol of liver cells. Patients with type III autoimmune hepatitis exhibit antibodies to the soluble liver antigen (SLA). This type III is not yet fully accepted as independent subgroup for autoimmune hepatitis by the "International Hepatitis Group".

LKM-1 associated AIH predominantly occurs in girls between 2 and 14 years of age underlining the importance of this parameter for pediatrics.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis.

Semin Liver Dis (1987) 4: 1 – 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group.

Hepatology (1993) 18: 998 – 1005

Manns MP et al.: LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in p450 IID6, a cytochrome p-450 monooxygenase.

J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 PRINCIPLE OF THE TEST

Anti-LKM-1 is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG antibodies to cytochrome P450 IID6.

The antibodies of the standards, controls, and diluted patient samples react with human recombinant cytochrome P450 IID6 immobilized on the solid phase of microtiter plates. The use of highly purified human recombinant cytochrome P450 IID6 guarantees the specific binding of LKM-1 antibodies of the specimen under investigation. Following an incubation period of 60 min at room temperature (RT), unbound serum components are removed by a wash step.

The bound IgG antibodies react specifically with anti-human-IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) within the incubation period of 30 min at RT. Excessive conjugate is separated from the solid-phase immune complexes by the following wash step.

HRP converts the colorless substrate solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) added into a blue product. The enzyme reaction is stopped by dispensing an acidic solution into the wells after 15 min at RT turning the solution from blue to yellow.

The optical density (OD) of the solution at 450 nm is directly proportional to the amount of specific antibodies bound. The standard curve is established by plotting the antibody concentrations of the standards (x-axis) and their corresponding OD values (y-axis) measured. The concentration of antibodies of the specimen is directly read off the standard curve.

3 PATIENT SAMPLES

3.1 Specimen collection and storage

Blood is taken by venipuncture. Serum is separated after clotting by centrifugation. Plasma can be used, too.

Lipaemic, hemolytic or contaminated samples should not be run.

The samples may be kept at 2 °C - 8 °C for up to three days. Long-term storage requires - 20 °C.

Repeated freezing and thawing should be avoided. If samples are to be used for several assays, initially aliquot samples and keep at -20 °C.

3.2 Preparation before use

Allow samples to reach room temperature prior to assay. Take care to agitate serum samples gently in order to ensure homogeneity.

Note: Patient samples have to be diluted **1 + 100 (v/v)**,
e.g. **10 µL sample + 1.0 mL sample diluent (C)**, prior to assay.

4 TEST COMPONENTS

For 96 determinations.

A [Ag 96]	Microtiter plate, 12 breakable strips per 8 wells coated with human recombinant cytochrome P450 IID6	1 vacuum sealed with desiccant
B [BUF WASH 10X]	Concentrated wash buffer, 10X sufficient for 1000 mL solution	100 mL concentrate capped white
C [DIL 5X]	Concentrated sample diluent, 5X	20 mL concentrate capped black
D [CONJ G]	Conjugate containing anti-human-IgG (goat) coupled with HRP	15 mL ready for use capped red
E [SOLN TMB]	Substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in citrate buffer containing hydrogen peroxide	15 mL ready for use capped blue
F [H2SO4 0.25 M]	Stop solution 0.25 M sulfuric acid	15 mL ready for use capped yellow
0 – 4 [CAL]	Standards (diluted serum) conc.: 1, 10, 30, 100, 300 U/mL	1 mL each ready for use
P [CONTROL +]	Positive control (diluted serum) conc.: see leaflet enclosed	1 mL ready for use capped red
N [CONTROL –]	Negative control (diluted serum) conc.: see leaflet enclosed	1 mL ready for use capped green

4.1 Materials required

- micropipettes (10 -100 and 100 - 1000 µL) with tips
- 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer
- microplate reader with optical filters for 450 nm and 620 nm or 690 nm
- dilution tubes, 2 mL
- distilled or de-ionized water

4.2 Size and storage

Anti-LKM-1 has been designed for 96 determinations.

The expiry date of each component is reported on its respective label that of the complete kit on the box labels.

Upon receipt, all components of the Anti-LKM-1 have to be kept at 2 °C - 8 °C, preferably in the original kit box.

After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage.

4.3 Preparation before use

The **microtiter plate** is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed microplate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of **sample diluent**

by diluting the concentrated diluent **5 times** (1 + 4) with de-ionized or distilled water.

For example, dilute 2 mL of the concentrate with 8 mL of distilled water.

The amount needed per patient sample is 1 mL.

Prepare a sufficient amount of **wash solution**

by diluting the concentrated wash buffer **10 times** (1 + 9) with de-ionized or distilled water.

For example, dilute 5 mL of the concentrate with 45 mL of distilled water per strip.

The wash solution and sample diluent prepared are stable at 2 °C - 8 °C up to 30 days.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle.

Avoid exposure of the TMB substrate solution to light!

5 ASSAY PROCEDURE

o **Dilute patient sera with sample diluent (C) 1 + 100 (v/v),**
e.g. **10 µL serum + 1.0 mL sample diluent (C).**

o **Avoid any time shift during pipetting of reagents and samples.**

1. Bring all reagents to room temperature (18 °C - 25 °C) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense
100 µL standards (0 - 4)
100 µL positive (P) and negative (N) control
100 µL diluted patient samples
into the respective wells.
3. Incubate **60 min** at room temperature (18 °C - 25 °C).
4. Decant, then wash each well **three** times using **300 µL** wash solution (made of B).
5. Add **100 µL** of conjugate (D) to each well.
6. Incubate **30 min** at room temperature (18 °C - 25 °C).
7. Decant, then wash each well **three** times using **300 µL** wash solution (made of B).
8. Add **100 µL** of substrate (E) to each well.
9. Incubate **15 min protected from light** at room temperature (18 °C - 25 °C).
10. Add **100 µL** of stop solution (F) to each well and mix gently.
11. Read the OD at **450 nm** versus 620 or 690 nm within **30 min** after adding the stop solution.

6 DATA PROCESSING

The standard curve is established by plotting the mean OD-values of the standards 0 - 4 on the ordinate, y-axis, (lin. scale) versus their respective Anti-LKM-1 IgG concentrations on the abscissa, x-axis, (log. scale).

LKM-1 antibody concentrations of the unknown samples are directly read off in U/mL against the respective OD values.

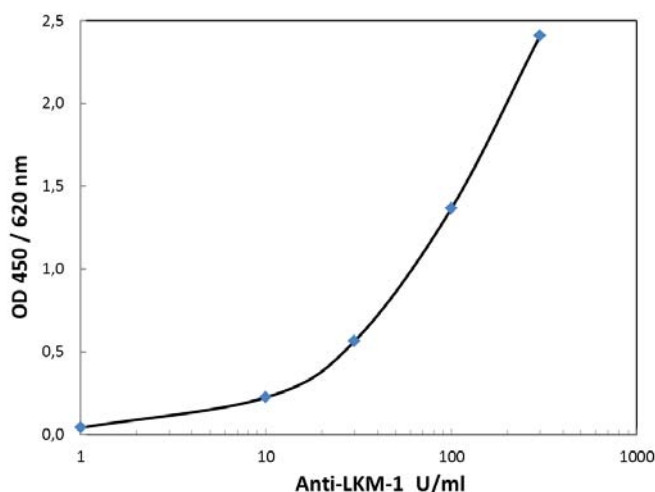
Using the recommended dilution of 1 + 100 (v/v) for patient's sera, no correction factor is necessary, as all other components of the kit are supplied accordingly.

Anti-LKM-1 may be used also with Computer Assisted Analysis using software able to plot log/lin curves with four-parameter fit.

6.1 Example of Typical Assay Results

Sample	OD (a)	OD (b)	OD (mean)	U/mL
Standard 0	0.037	0.044	0.041	1
Standard 1	0.221	0.226	0.224	10
Standard 2	0.568	0.560	0.564	30
Standard 3	1.406	1.328	1.367	100
Standard 4	2.296	2.186	2.241	300
Patient 1	0.960	0.967	0.964	60

TYPICAL STANDARD CURVE



Do not use this example for interpreting results.

Specimens with an OD > standard 4, should be diluted (with Sample Diluent) and tested again. Results are multiplied with the dilution factor chosen.

6.2 Test validity

The test run is valid if:

- o the mean OD of the standard 4 is ≥ 1.2
- o concentration of Control P see leaflet enclosed
- o Control N is negative

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

7 REFERENCE VALUES

LKM-1 antibodies	U/mL
positive	> 15
negative	≤ 15

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges for serum Anti-LKM-1 levels, as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the above mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

7.1 Limitations of Method

Healthy individuals should be tested negative by the Anti-LKM-1. However, LKM-1 autoantibody positive apparently healthy persons do occur.

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. Physicians are supposed to consider all clinical and laboratory findings possible to state a diagnosis.

8 CHARACTERISTIC ASSAY DATA

8.1 Calibration

No international reference material for this parameter is available thus the assay is calibrated in arbitrary units.

8.2 Linearity

Selected positive serum samples have been tested by this assay and found to dilute linearly. However, due to the heterogeneous nature of human autoantibodies there might be sera that do not follow this rule.

8.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of this assay was determined at 1.0 U/mL.

8.4 Specificity

No cross reactivity to other autoantigens have been found.

8.5 Precision

Intra assay variability

Sample	Mean U/mL	Standard deviation	CV (%)
1	182.5	6.4	3.5
2	61.8	2.1	3.5
3	19.6	0.6	3.1
4	5.1	0.4	8.1

Inter assay variability

Sample	Mean U/mL	Standard deviation	CV (%)
1	190.1	6.7	3.5
2	63.8	1.4	2.3
3	19.7	0.2	1.2
4	5.4	0.1	2.2

9 SAFETY PRECAUTIONS

- o **This kit is for in vitro use only.** Follow the working instructions carefully. DRG and its authorized distributors shall not be liable for damages indirectly or consequentially brought about by changing or modifying the procedure indicated. The kit should be performed by trained technical staff only.
- o The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. The same relates to the stability stated for reconstituted reagents.
- o Do not use or mix reagents from different lots.
- o Do not use reagents from other manufacturers.
- o Avoid time shift during pipetting of reagents.
- o All reagents should be kept at 2 °C - 8 °C before use in the original shipping container.
- o Some reagents contain small quantities of Neolone M10 ($\leq 0.05\%$) as a preservative. Do not swallow reagents, and avoid contact with mucus membranes.
- o Source materials derived from human body fluids or organs used in the preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg and HIV as well as for HCV antibodies. However, no known test guarantees the absence of such viral agents. Therefore, handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.
- o Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:
 - Do not smoke, eat or drink while handling kit material,
 - Always use protective gloves,
 - Never pipette material by mouth,
 - Wipe up spills promptly, washing the affected surface thoroughly with a decontaminant.

1 ANWENDUNG

Anti-LKM-1 ist ein Reagenziensatz zur quantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Cytochrom p450 IID6 in humanem Serum oder Plasma zur Diagnose der autoimmunen Hepatitis (AIH).

Der Formenkreis der Primär autoimmunen Lebererkrankungen (PAL) umfasst die Autoimmune Hepatitis (AIH), die Primär Biliäre Zirrhose (PBC) und die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC). Die Klinik der PAL unterscheidet sich in den meisten Fällen nicht grundsätzlich von anderen chronischen Lebererkrankungen. Ca. 15% der Fälle mit chronischen Lebererkrankungen weisen eine autoimmune Pathogenese auf. Deshalb werden nach Ausschluss einer infektiösen Ätiopathogenese, insbesondere von Virusinfektionen, für die Differentialdiagnose der PAL vor allem die Bestimmung von verschiedenen Autoantikörperspezifitäten herangezogen.

Bei Patienten mit einer AIH können verschiedene Autoantikörperreaktivitäten bestimmt werden. An Hand der Vielzahl der heute bekannten Autoantikörper wird eine Unterteilung der autoimmunen Hepatitis in 3 Subgruppen diskutiert.

Charakteristisch für den Typ I ist der Nachweis von antinuklearen Antikörpern (ANA) und Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA). ASMA erkennen antigene Strukturen, die durch polymeres F-Aktin gebildet werden. Hingegen werden beim Typ II Antikörper gegen Leber- und Nierenmikrosome (LKM-1 Antikörper) gefunden, deren Zielantigen das Cytochrom p450 IID6 darstellt. Ebenfalls spezifisch für den Typ II sind LC1 Antikörper, die das im Zytosol nachweisbare Leberenzym Formiminotransferase Zyklodeaminase erkennen. Seren von Patienten mit Typ III Autoimmunhepatitis weisen lediglich Antikörper gegen das lösliche Leberantigen (SLA Antikörper) auf. Die „International Hepatitis Group“ hat allerdings diesen Subtyp der Autoimmunen Hepatitiden nur vorläufig als selbständiges Krankheitsbild akzeptiert.

Die LKM-1 assoziierte AIH Typ II tritt vorwiegend bei Mädchen im Alter von 2 bis 14 Jahren auf. Die Bestimmung von Antikörpern gegen LKM-1 ist daher in der Pädiatrie von großer Bedeutung.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis.

Semin Liver Dis (1987) 4: 1 - 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group.

Hepatology (1993) 18: 998 - 1005

Manns MP et al.: LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in p450 IID6, a cytochrome p-450 monooxygenase.

J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 TESTPRINZIP

Anti-LKM-1 ist ein Reagenziensatz zur quantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Cytochrom p450 IID6 in humanem Serum oder Plasma.

Die LKM-1 Antikörper in den Standards, der Positiv-Kontrolle und den verdünnten Patientenproben reagieren im ersten Reaktionsschritt mit dem an der festen Phase gebundenen rekombinanten Cytochrom p450 IID6. Nicht gebundene Serumkomponenten werden nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) durch einen Waschschrift entfernt.

Die gebundenen Antikörper reagieren im zweiten Reaktionsschritt spezifisch mit anti-human-IgG, das an Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt ist. Überschüssige Konjugatmoleküle werden nach 30 Minuten Inkubationszeit bei RT von den an der festen Phase gebundenen Immunkomplexen durch einen Waschschrift getrennt.

Die POD setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 15 Minuten Inkubation durch Zugabe einer sauren Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt.

Die bei 450 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Mit den ermittelten OD-Werten der Standards und deren entsprechenden Konzentrationen an Antikörpern wird eine Standardkurve erstellt. Die unbekannten Patientenwerte werden an dieser Standardkurve direkt abgelesen.

3 PATIENTENPROBEN

3.1 Gewinnung und Lagerung

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation isolieren. Plasma kann ebenfalls verwendet werden.

Lipämische, hämolisierte oder kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.

Die Lagerung der Proben ist bis zu 3 Tagen bei 2 °C - 8 °C möglich. Darüber hinaus müssen die Proben bei - 20 °C eingefroren werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden, ggf. sollte vor dem Einfrieren aliquotiert werden.

3.2 Vorbereitung und Verwendung

Vor dem Einsatz im Anti-LKM-1 werden die Proben auf Raumtemperatur gebracht.

Grundsätzlich sollte durch kurzes Aufschütteln eine entsprechende Homogenität gesichert werden.

Achtung:

Die Patientenproben müssen vor Einsatz im Test **1 + 100** (v/v) verdünnt werden,

z. B. **10 µL Probe + 1,0 mL Probenverdünner (verdünnt aus C)**

4 TESTKOMPONENTEN

Für 96 Bestimmungen.

A [Ag 96]	Mikrotiterplatte mit 12 teilbaren Streifen zu je 8 Kavitäten beschichtet mit rekombinanten Cytochrom p450 IID6.	1 vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
B [BUF WASH 10X]	Waschpuffer, 10-fach für 1000 mL Lösung	100 mL Konzentrat weiße Kappe
C [DIL 5X]	Probenverdünner, 5-fach für 100 mL Lösung	20 mL Konzentrat schwarze Kappe
D [CONJ G]	Konjugat enthält anti-human-IgG (Ziege), gekoppelt mit POD	15 mL gebrauchsfertig rote Kappe
E [SOLN TMB]	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid	15 mL gebrauchsfertig blaue Kappe
F [H2SO4 0.25 M]	Stopplösung 0.25 M Schwefelsäure	15 mL gebrauchsfertig gelbe Kappe
0 – 4 [CAL]	Standards (Verdünntes Serum) Konz.: 1, 10, 30, 100, 300 U/mL	je 1 mL gebrauchsfertig
P [CONTROL +]	Positive Kontrolle (Verdünntes Serum) Konz.: siehe Beipackzettel	1 mL gebrauchsfertig rote Kappe
N [CONTROL –]	Negative Kontrolle (Verdünntes Serum) Konz.: siehe Beipackzettel	1 mL gebrauchsfertig grüne Kappe

4.1 Zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Mikropipetten (10 – 100 und 100 - 1000 µL) mit Spitzen
- 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischen Filtern für 450 nm und 620 nm oder 690 nm
- Röhrchen zur Probenverdünnung, 2 mL
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

4.2 Menge und Lagerung

Jede Packung Anti-LKM-1 enthält die Reagenzien für 96 Bestimmungen.

Das Verfallsdatum des kompletten Reagenziensatzes ist auf dem Außenetikett des Testbesteckes angegeben. Die Verfallsdaten der Einzelreagenzien können ggf. darüber hinausgehen und sind auf den jeweiligen Reagenzien vermerkt.

Bis zur Verwendung sind alle Reagenzien des Anti-LKM-1 bei 2 °C - 8 °C zu lagern.

Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 °C - 8 °C mindestens 2 Monate haltbar.

4.3 Vorbereitung und Verwendung

Die **Mikrotiterplatte** mit teilbaren Strips ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach dem Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Probenverdünnerkonzentrat 1:5 (1 + 4) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 2 mL Konzentrat + 8 mL destilliertes Wasser,

pro Patientenprobe wird 1 mL verdünnter Probenpuffer benötigt (siehe oben).

Waschpufferkonzentrat 1:10 (1 + 9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 5 mL Waschpufferkonzentrat + 45 mL destilliertes Wasser pro Streifen.

Die auf diese Weise verdünnten Lösungen sind bei 2 °C - 8 °C ca. 30 Tage haltbar.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen.

Substrat lichtgeschützt aufbewahren.

5 TESTDURCHFÜHRUNG

o Patientenproben 1 + 100 (v/v) vorverdünnen

z. B. 10 µL Serum + 1,0 mL Probenverdünner (aus C)

o Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

1. Testreagenzien und benötigte Testkavitäten auf Raumtemperatur (RT) (18 °C - 25 °C) bringen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
2. Pipettieren von
100 µL Standards (0 - 4),
100 µL Kontrollen (P) und (N),
100 µL der **1 + 100** verdünnten Patientenseren
in die vorgesehenen Kavitäten.
3. **60 Minuten** bei RT (18 °C - 25 °C) inkubieren.
4. Dekantieren und **3-mal** mit **300 µL** Waschlösung (verdünnt aus B) waschen
5. **100 µL** Konjugat (D) in jede Kavität pipettieren.
6. **30 Minuten** bei RT (18 °C - 25 °C) inkubieren.
7. Dekantieren und **3-mal** mit **300 µL** Waschlösung (verdünnt aus B) waschen.
8. **100 µL** Substrat (E) in jede Kavität pipettieren.
9. **15 Minuten** bei RT (18 °C - 25 °C) **im Dunkeln** inkubieren.
10. **100 µL** Stopplösung (F) in jede Kavität pipettieren und kurz schütteln.
11. Messen der OD bei **450 nm** gegen 620 (690) nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

6 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die OD-Mittelwerte (MW) der Standards 0 - 4 werden auf der Ordinate (lin.) gegen die entsprechenden LKM-1 Antikörper-Konzentrationen (U/mL) (Abszisse, log. Maßstab) aufgetragen.

Daraus wird eine Standardkurve gezeichnet, aus der sich über die OD-MW die jeweiligen Anti-LKM-1 Antikörper Konzentrationen der unbekannten verdünnten Patientenproben direkt ablesen lassen.

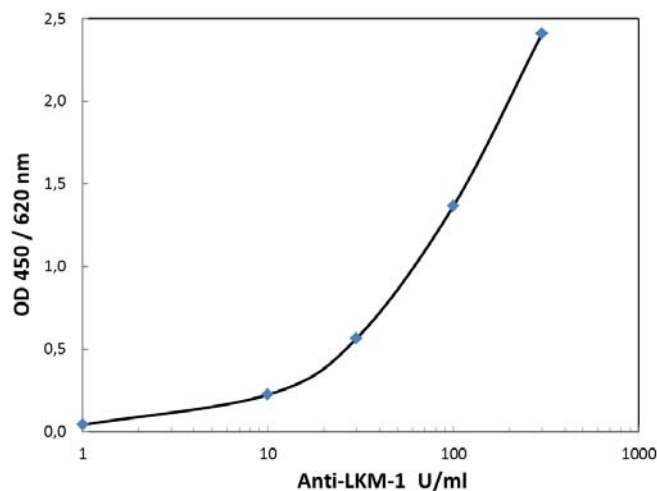
Sofern die oben angegebene Probenverdünnung 1 + 100 angewendet wird, bedarf es keines Multiplikationsfaktors zur Ermittlung der Konzentration der LKM-1 Antikörper, da die Standards bereits in dieser Verdünnung vorliegen.

Diese Auswertung lässt sich auch automatisch über die integrierte Auswerteeinheit des Mikrotiterplatten-Photometers durchführen.

6.1 Berechnungsbeispiel

Probe	OD (a)	OD (b)	OD (MW)	U/mL
Standard 0	0,037	0,044	0,041	1
Standard 1	0,221	0,226	0,224	10
Standard 2	0,568	0,560	0,564	30
Standard 3	1,406	1,328	1,367	100
Standard 4	2,296	2,186	2,241	300
Patient 1	0,960	0,967	0,964	60

TYPISCHE STANDARDKURVE



Dieses Beispiel darf nicht zur Berechnung von Patientenwerten verwendet werden.

Bei Proben, deren OD-Werte die OD des Kalibrators 4 überschreiten, ist die Bestimmung mit einer höheren Proben-Vorverdünnung (in Probenverdünner) zu wiederholen. Der entsprechende Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

6.2 Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- o OD-Mittelwert des Standards 4 $\geq 1,2$
- o Der für die Kontrolle P bestimmte Wert liegt innerhalb des angegebenen Bereiches (s. Beipackzettel)
- o Kontrolle N ist negativ

Sind diese Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Gebrauchsanweisung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

7 REFERENZWERTE

LKM-1 Antikörper	U/mL
positiv	> 15
Normalbereich	≤ 15

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen Referenzbereiche für Anti-LKM-1 Autoantikörperspiegel bestimmen sollte. Oben genannte Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

7.1 Grenzen der Methode

Gesunde Individuen sollten mit dem Anti-LKM-1 Testbesteck negativ bestimmt werden. Asymptomatische Probanden können jedoch positive Autoantikörper gegen Cytochrom p450 IID6 aufweisen.

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle möglichen klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 Kalibrierung

Mangels eines internationalen Referenzstandards werden die Ergebnisse in arbiträren Einheiten U/mL angegeben.

8.2 Parallelität

Für ausgewählte Seren konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und gemessener Antikörperkonzentration ermittelt werden. Aufgrund der Heterogenität humaner Antikörper ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Seren ein nichtlineares Verhalten zeigen.

8.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Anti-LKM-1 wurde mit 1,0 U/mL ermittelt.

8.4 Spezifität

Es wurden keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Autoantigenen gefunden.

8.5 Präzision

Intraassay-Varianz

Probe	MW U/mL	Standardabw.	CV (%)
1	182,5	6,4	3,5
2	61,8	2,1	3,5
3	19,6	0,6	3,1
4	5,1	0,4	8,1

Interassay-Varianz

Probe	MW U/mL	Standardabw.	CV (%)
1	190,1	6,7	3,5
2	63,8	1,4	2,3
3	19,7	0,2	1,2
4	5,4	0,1	2,2

9 ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- o Dieser Reagenziensatz ist **zum in vitro-Gebrauch** bestimmt und muss von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.
- o Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.
- o Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.
- o Dies gilt auch für die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks.
- o Die empfohlene Lagertemperatur angebrochener Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2 °C - 8 °C.
- o Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Neolone M10 ($\leq 0,05\%$) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.
- o Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. AK gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- o Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten. Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:
 - Nicht essen, trinken oder rauchen!
 - Nie mit dem Mund pipettieren!
 - Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Seren tragen!
 - Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!
- o Wir empfehlen, mittels laborinterner Kontrollseren eigene Qualitätskontrollen durchzuführen (s.a. Eichordnung, Bundesgesetzblatt I, S. 1657, 1988 sowie Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Dt. Ärzteblatt 98, Heft 42, S. A2747-59, 2001).



1 DESTINAZIONE D'USO

Anti-LKM-1 viene utilizzato per la determinazione quantitativa di anticorpi IgG anti citocromo p450 IID6 nel siero e plasma umano per la diagnosi dell'epatite autoimmune (AIH).

Il gruppo delle malattie epatiche autoimmuni primarie (PAL) comprende epatite autoimmune, cirrosi biliare primaria (PBC) e la colangite sclerosante primitiva (PSC).

Il quadro clinico di PAL è nella maggior parte dei casi, non diverso da altre malattie croniche del fegato. Circa il 15% di tutti i casi con malattie croniche del fegato mostra una patogenesi autoimmune. Pertanto, dopo l'esclusione di un'eziologia infettiva, soprattutto da virus, si raccomanda la determinazione dei diversi autoanticorpi.

I pazienti affetti da epatite autoimmune mostrano una varietà di autoanticorpi. A causa della comparsa di diverse specificità anticorpali la classificazione delle AIH nei diversi sottogruppi è discussa. Il tipo I è caratterizzato dalla presenza di anticorpi antinucleo (ANA) e anticorpi anti muscolatura liscia (ASMA). ASMA si riconosce dalle strutture antigeniche formate dalla polimerica F-actina. Per il tipo II è stata riscontrata un'alta prevalenza di anticorpi anti fegato e antigeni microsomiali anti rene (LKM). Anticorpi LKM1 riconoscono epitopi del citocromo P450 IID6, una 50 kDa, proteina citoplasmatica trovata in epatociti e cellule renali tubulari prossimali. Gli anticorpi LC1 sono specifici anche per l'epatite di tipo II. Il rispettivo antigene è la formiminotransferasi / ciclodeaminasi situato nel citosol delle cellule epatiche. I pazienti con epatite autoimmune di tipo III mostrano anticorpi contro l'antigene solubile epatico (SLA). Questo tipo III non è ancora pienamente accettato come sottogruppo indipendente per l'epatite autoimmune da parte del "Gruppo Epatite Internazionale".

AIH LKM-1 associata si verifica prevalentemente nelle ragazze tra 2 e 14 anni sottolineando l'importanza di questo parametro per la pediatria.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis.

Semin Liver Dis (1987) 4: 1 – 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group.

Hepatology (1993) 18: 998 – 1005

Manns MP et al.: LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in p450 IID6, a cytochrome p-450 monooxygenase.

J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Anti-LKM-1 è un saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli anticorpi IgG anti citocromo p450 IID6.

Gli anticorpi dei calibratori, dei controlli e i campioni diluiti dei pazienti, reagiscono con citocromo p450 IID6 umano ricombinato immobilizzato sulla fase solida delle piastre per microtitolazione. L'elevata purezza del citocromo p450 IID6 umano ricombinato garantisce lo specifico legame degli anticorpi LKM-1 del campione in esame. Successivamente ad un periodo di incubazione di 60 minuti a temperatura ambiente, i componenti del siero non legati sono rimossi con una fase di lavaggi.

Entro un periodo di incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, gli anticorpi legati reagiscono in maniera specifica con gli anticorpi anti IgG umana coniugati con la perossidasi di rafano (HRP). Il coniugato in eccesso viene separato dai complessi immunitari in fase solida nella seguente fase di lavaggio.

L'aggiunta di HRP converte il substrato in soluzione incolore 3,3', 5,5'-tetrametil - benzidina (TMB), in un prodotto blu. Questa reazione enzimatica viene interrotta, dopo 15 minuti a temperatura ambiente, mediante l'aggiunta nei pozzetti di una soluzione acida, facendo virare la soluzione da blu a giallo.

La densità ottica (OD) della soluzione a 450 nm è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici legati. La curva standard è stabilita tracciando le concentrazioni di anticorpi dei calibratori (asse x) e i corrispondenti valori OD (asse y) misurati. La concentrazione di anticorpi del campione viene letta direttamente dalla curva di calibrazione.

3 CAMPIONI DAI PAZIENTI

3.1 Raccolta e conservazione del campione

Il sangue viene prelevato mediante venipuntura. Il siero è separato dopo la coagulazione mediante centrifugazione. Il plasma può anche essere usato.

Campioni lipemici, emolitici o contaminati non dovrebbero essere utilizzati.

I campioni possono essere conservati fino a 3 giorni a 2 °C - 8 °C. La conservazione a lungo termine richiede -20 °C

Il congelamento e lo scongelamento ripetuto dovrebbe essere evitato. Se i campioni devono essere utilizzati per numerose prove, aliquotare i campioni all'inizio e conservare la aliquote a - 20 °C.

3.2 Preparazione dei campioni

Lasciare che i campioni raggiungano la temperatura ambiente prima del saggio.

Avere cura di agitare i campioni di siero delicatamente, in modo da garantirne omogeneità.

Nota: I campioni dei pazienti devono essere diluiti **1 + 100 (v/v)**,
ad esempio **10 µL di campione + 1.0 mL (C) di diluente**, prima del saggio.

4 COMPONENTI DEL SAGGIO

Per 96 determinazioni

A [Ag 96]	Piastre per microtitolazione , 12 strisce separabili per 8 pozzetti rivestiti con citocromo p450 IID6 umano ricombinato	1 sigillato sotto vuoto con essiccante
B [BUF WASH 10X]	Tampone di lavaggio concentrato, 10X sufficiente per 1000 mL soluzione	100 mL concentrato tappo bianco
C [DIL 5X]	Diluente dei campioni concentrato, 5X	20 mL concentrato tappo nero
D [CONJ G]	Coniugato contenente IgG anti-umano (origine capra) legato a HRP	15 mL pronto per l'uso tappo rosso
E [SOLN TMB]	Substrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina in tampone citrato contenente perossido di idrogeno	15 mL pronto per l'uso tappo blu
F [H2SO4 0.25 M]	Soluzione di stop 0,25 M acido solforico	15 mL pronto per l'uso tappo giallo
0 – 4 [CAL]	Calibratori (siero diluito), conc.: 1, 10, 30, 100, 300 U/mL	1 mL ognuno pronto all'uso
P [CONTROL +]	Controllo positivo (siero diluito), conc.: vedere foglio illustrativo allegato	1 mL pronto per l'uso tappo rosso
N [CONTROL –]	Controllo negativo (siero diluito), conc.: vedere foglio illustrativo allegato	1 mL pronto per l'uso tappo verde

4.1 Materiale aggiuntivo richiesto

- micropipette (100 - 1000 µL e 10 - 100 µL) con puntali di plastica monouso
- 8 canali di lavaggio a pettine con pompa del vuoto e una bottiglia o micropiastra per rifiuti
- lettore di micropiastre con filtri ottici per 450 nm e 620 nm o 690 nm
- provette, 2 mL
- acqua distillata o deionizzata

4.2 Dimensioni e conservazione

Anti LKM-1 è stato progettato per 96 determinazioni.

La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulla rispettiva etichetta del kit completo nella scatola delle etichette.

Alla ricezione, tutti i componenti del Anti-LKM-1 devono essere mantenuti a 2 °C - 8 °C, preferibilmente nella scatola originale del kit.

Dopo l'apertura di tutti i componenti del kit sono stabili per almeno 2 mesi, a condizione di una corretta conservazione.

4.3 Preparazione prima dell'uso

La **piastra per microtitolazione** è sigillata sotto vuoto in un foglio contenente dell'essiccante. La piastra è costituita da un telaio e da strisce separabili di pozzetti. Prima di aprire la micropiastra sigillata, permetterle di raggiungere temperatura ambiente. I pozzetti non utilizzati devono essere conservati a 2 °C - 8 °C e protetti dall'umidità nella foderina originale e dopo richiuderli accuratamente.

Preparare una quantità sufficiente di **diluyente del campione** diluendo il diluyente concentrato **5 volte** (1+4) con acqua deionizzata o distillata.

Ad esempio, diluire 2 mL di concentrato con 8 mL di acqua distillata.

Per campione del paziente è necessario 1 mL di tampone campione diluito

Il diluyente dei campioni preparato è stabile fino a 30 giorni a 2 °C - 8 °C.

Preparare una quantità sufficiente di **soluzione di lavaggio** diluendo il tampone di lavaggio concentrato **10 volte** (1+9) con acqua deionizzata o distillata.

Ad esempio, diluire 5 mL di concentrato con 45 mL di acqua distillata per una striscia.

La soluzione di lavaggio preparata è stabile fino a 30 giorni a 2 °C - 8 °C.

Assicurarsi che il tempo di immersione del tampone di lavaggio nei pozzetti sia di almeno 5 secondi per ciclo di lavaggio.

Evitare l'esposizione del substrato TMB alla luce!

5 ESEGUIMENTO DEL TEST

- o **Diluire il siero dei pazienti con il diluyente dei campioni (C) 1 + 100 (v/v), p.es. 10 µL di siero + 1,0 mL diluyente dei campioni (di C).**
 - o **Evitare qualsiasi cambiamento nei tempi di pipettamento dei reagenti e campioni.**
1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) prima dell'uso. Mescolare delicatamente per evitare la schiuma.
 2. Dispensare
 - 100 µL** degli calibratori (0 - 4)
 - 100 µL** del controllo positivo (P) e negativo (N)
 - 100 µL** di campioni diluitinei pozzetti rispettivi.
 3. Incubare **60 min** a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
 4. Decantare, lavare ogni pozzetto **3 volte** usando **300 µL** di tampone di lavaggio (preparato con B).
 5. Aggiungere **100 µL** del tracciante enzimatico (D) in ogni pozzetto.
 6. Incubare **30 min** a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
 7. Decantare, lavare ogni pozzetto **3 volte** usando **300 µL** di tampone di lavaggio (preparato con B).
 8. Aggiungere **100 µL** del substrato (E) in ogni pozzetto.
 9. Incubare **15 min** protetto dalla luce a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
 10. Aggiungere **100 µL** della soluzione d'arresto (F) in ogni pozzetto e agitare cautamente.
 11. Determinare la densità ottica a **450 nm** contro 620 nm o 690 nm **entro 30 min** dopo l'aggiunta della soluzione d'arresto.

6 CALCOLO DEI RISULTATI

La curva di calibrazione è stabilita tracciando i valori medi di OD dei calibratori 0 - 4 sull'asse delle ordinate, asse y, (scala lineare) contro le loro rispettive concentrazioni Anti-LKM-1 sulle ascisse, asse x, (scala logaritmica).

Concentrazioni Anti-LKM-1 dei campioni sconosciuti sono direttamente lette in U / mL contro i rispettivi valori di OD.

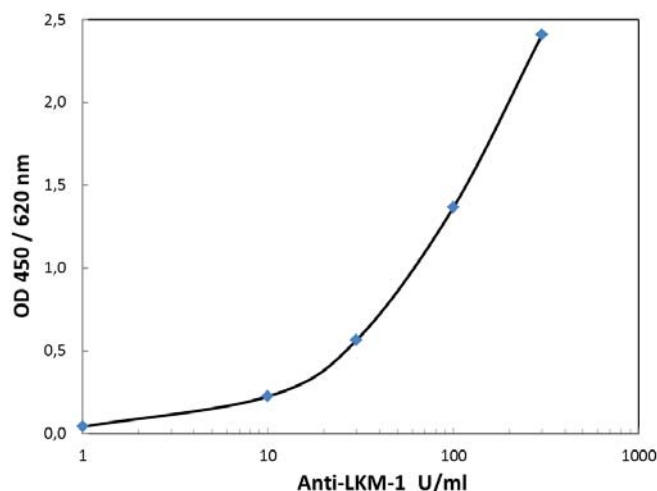
Utilizzando siero del paziente alla diluizione raccomandata di 1+100 (v/v), non è necessario nessun fattore di correzione, in quanto tutti gli altri componenti del kit sono forniti conformemente a questa diluizione.

Anti-LKM-1 può essere anche determinato usando un programma di elaborazione dati elettronico o attraverso la software dello spettrofotometro.

6.1 Esempio del tipico risultato del saggio

Pozzetti	OD (a)	OD (b)	OD (media)	U/mL
Calibratore 0	0,037	0,044	0,041	1
Calibratore 1	0,221	0,226	0,224	10
Calibratore 2	0,568	0,560	0,564	30
Calibratore 3	1,406	1,328	1,367	100
Calibratore 4	2,296	2,186	2,241	300
Paziente 1	0,960	0,967	0,964	60

CURVA DI CALIBRAZIONE TIPO



Non utilizzare questo esempio per l'interpretazione dei risultati.

I campioni con OD > calibratore 4, dovrebbero essere diluiti con diluente del campione e testati di nuovo. I risultati sono moltiplicati per il fattore di diluizione scelto.

6.2 Validità del saggio

Il test è valido se:

- o Il valore OD medio dello calibratore 4 è ≥ 1.2
- o Per la concentrazione di controllo P vedi foglio allegato
- o Controllo N è negativo

Se non si verificano questi criteri di validità, ripetere il test e assicurarsi che il procedimento viene eseguito correttamente (tempi di incubazione e temperature, diluizione dei campioni e dei tamponi di lavaggio, passaggi di lavaggio, ecc.). In caso di ripetuto insuccesso contattare il distributore.

7 VALORI DI RIFERIMENTO

LKM-1 anticorpi	U/mL
positivo	> 15
negativo	≤ 15

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisce i propri valori di referenza normali e patologici per i livelli di anti-LKM nel siero, come accade per altri parametri diagnostici.

Perciò, i valori di referenza sopra indicati servono soltanto come valori guida a valori che si possono aspettare.

7.1 Limitazioni del test

Individui sani dovrebbero risultare negativi con il Anti-LKM-1. Comunque, accade che si rivelano LKM-1 auto-anticorpi in individui apparentemente sani.

La diagnosi clinica non dovrebbe basarsi esclusivamente sui risultati di metodi diagnostici in vitro. Si aspetta che i medici considerano tutti i parametri clinici e diagnostici per enunciare una diagnosi.

8 CARATTERISTICHE DEL TEST

8.1 Calibrazione

Dato che non esiste alcun materiale internazionale di riferimento per questo parametro, il test è calibrato in unità arbitrarie U/mL.

8.2 Linearità

Campioni di siero selezionati positivi sono stati analizzati con questo test e trovati di diluire linearmente. Comunque, data l'eterogeneità degli auto-anticorpi umani, possono esserci sieri che non seguono questa regola.

8.3 Sensitività

La sensibilità analitica di questo test è stato determinato a 1,0 U/mL.

8.4 Specificità

Non è stata trovata alcuna reazione ad incrocio con altri auto-antigeni.

8.5 Precisione

Variabilità intra-assay

Campione	Medio (U/mL)	Deviazione standard	CV (%)
1	182,5	6,4	3,5
2	61,8	2,1	3,5
3	19,6	0,6	3,1
4	5,1	0,4	8,1

Variabilità inter-assay

Campione	Medio (U/mL)	Deviazione standard	CV (%)
1	190,1	6,7	3,5
2	63,8	1,4	2,3
3	19,7	0,2	1,2
4	5,4	0,1	2,2

9 NOTE GENERALI E PRECAUZIONI

- o **Questo test è per la diagnosi in vitro solamente.** Seguire attentamente le istruzioni. DRG e i suoi distributori autorizzati non sono responsabili per danni indirettamente o conseguentemente causati da cambiamenti o modifiche il procedimento indicato. Il test deve essere eseguito esclusivamente da operatori tecnici.
- o Le date di scadenze riportati sulle etichette devono essere osservate. Lo stesso vale per la stabilità di reagenti diluiti.
- o Non mescolare componenti provenienti da lotti differenti.
- o Non usare reagenti da altri distributori.
- o Evitare di ritardare l'aggiunta dei reagenti durante il procedimento.
- o Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 °C - 8 °C nei rispettivi contenitori originali prima dell'uso.
- o Alcuni reagenti contengono tracce di Neolone M10 ($\leq 0.05\%$) come conservanti. Questi non devono essere ingoiati o portati a contatto con la pelle o le mucose.
- o I materiali in questo kit provenienti da fluidi umani o organi sono stati testati e trovati d'essere negativi a HbsAg e HIV, come a anticorpi HCV. Nessun test garantisce comunque l'assenza di agenti virali. Si raccomanda perciò di trattare tutti i componenti del kit come potenzialmente pericolosi.
- o Dato che il kit contiene componenti potenzialmente pericolosi, le precauzioni seguenti devono essere osservati:
 - Non fumare, mangiare o bere durante l'esecuzione del test,
 - Portare sempre guanti protettivi,
 - Non pipettare alcun materiale a bocca,
 - Pulire immediatamente eventuali spruzzi, lavando le superficie con un decontaminante.

1 INDICACION DE USO

Anti-LKM-1 es utilizado para la determinación de anticuerpos IgG contra citocromo p450 IID6 en suero humano para el diagnóstico del hepatitis autoinmune (HAI).

El grupo de enfermedades autoinmunes primarias del hígado (EAP) incluye a la hepatitis autoinmune (HAI), a la colangitis esclerosante primaria (CEP) y la cirrosis biliar primaria (CBP).

El cuadro clínico de las EAP no es -en la mayoría de los casos- muy diferente del de otras enfermedades hepáticas crónicas (EHC). Cerca de un 15% de los pacientes con EHC muestran una patogénesis autoinmune. Por tal razón, y luego de descartar una etiología infecciosa (principalmente viral), se recomienda la determinación de autoanticuerpos específicos.

Los pacientes afectados por HAI desarrollan una variedad de autoanticuerpos. Debido a la aparición de diferentes especificidades de anticuerpos, se discute la clasificación de AIH en diferentes subgrupos. El tipo I se caracteriza por la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos contra el músculo liso (ASMA). Para el tipo II, se ha establecido una alta prevalencia de anticuerpos contra antígenos microsomales del hígado y riñón (LKM). Los anticuerpos LKM1 reconocen epítopes del citocromo P450 2D6. Los anticuerpos LC1 son también específicos para hepatitis de tipo II. El antígeno respectivo es la formiminotransferasa / ciclodeaminasa localizada en el citosol de las células del hígado. Los pacientes con hepatitis autoinmune de tipo III, presentan anticuerpos contra el antígeno soluble del hígado (SLA). El tipo III, aún no es aceptado como un subgrupo independiente de hepatitis autoinmune por el "Grupo Internacional de Hepatitis".

LKM-1 associated AIH predominantly occurs in girls between 2 and 14 years of age underlining the importance of this parameter for pediatrics.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis.
Semin Liver Dis (1987) 4: 1 – 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group.
Hepatology (1993) 18: 998 – 1005

Manns MP et al.: LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in p450 IID6, a cytochrome p-450 monooxygenase.
J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 PRINCIPIO DEL TEST

Anti-LKM-1 es un enzimoimmunoensayo para la determinación cuantitativa de anticuerpos contra la microsomas de hígado-riñón tipo 1 (liver-kidney microsomes type 1, LKM-1) en suero y plasma humano.

Los anticuerpos de los calibradores, del control, y de las muestras diluidas reaccionan con un antígeno citocromo p450 IID6 (humano recombinante) e inmovilizado en la fase sólida de la microplaca. Tras un período de incubación de 60 minutos a temperatura ambiente (TA), los componentes del suero no fijado son extraídos mediante un paso de lavado.

Los anticuerpos IgG fijados reaccionan específicamente en un paso siguiente de incubación de 30 minutos a TA con IgG anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El conjugado en exceso es separado de los inmuno-complejos fijados mediante lavado.

La HRP convierte la solución incolora de 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) en un producto de color azul. La reacción enzimática se interrumpe añadiendo una solución ácida. Luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la solución vira de color azul a amarillo.

La densidad óptica (DO) de la solución a 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos específicamente. La curva estándar se establece relacionando los valores de las concentraciones de anticuerpo de los calibradores (eje X), con sus valores respectivos de DO (eje Y). La concentración de los anticuerpos en las muestras se lee directamente de la curva estándar.

3 MUESTRAS DE PACIENTES

3.1 Extracción y conservación de las muestras

La sangre se extrae por punción venosa. Tras el periodo de coagulación se separa el suero por centrifugación. Plasma se puede utilizar también.

No deben utilizarse muestras hemolisadas o contaminadas, ni con un elevado contenido en lípidos.

Las muestras pueden conservarse entre 2 °C - 8 °C hasta por 3 días. Para periodos prolongados se deben conservar a -20 °C

Deben evitarse ciclos repetidos de congelación/descongelación. Si las muestras se van a utilizar en varios ensayos, se recomienda que se hagan alícuotas desde el principio y se conserven a -20 °C

3.2 Preparación antes del uso

Las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de comenzar el ensayo.

Se debe tener la precaución de agitar cuidadosamente las muestras de suero para asegurar su homogeneidad.

Nota: Las muestras de los pacientes deben diluirse **1 + 100** (v/v) antes de comenzar con el ensayo, ej. **10 µL de la muestra + 1 mL del diluyente de la muestra** (elaborada a partir de C).

4 COMPONENTES DEL TEST

para 96 determinaciones

A [Ag 96]	Placa de microtitulación, 12 tiras quebrables por 8 pocillos (total 96 pocillos) cubiertos con citocromo p450 IID6 (humano recombinante)	1 Sellado a vacío con deseccante
B [BUF WASH 10X]	Buffer de lavado concentrado 10X Suficiente para 1000 mL de solución	100 mL Concentrado tapa blanca
C [DIL 5X]	Diluyente de muestra concentrado Suficiente para 100 mL de solución	20 mL Concentrado tapa negra
D [CONJ G]	Conjugado conteniendo IgG anti-humano (cabra) acoplado con HPR	15 mL listo para uso tapa roja
E [SOLN TMB]	Sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en buffer citrato conteniendo peróxido de hidrógeno	15 mL listo para uso tapa azul
F [H2SO4 0.25 M]	Solución Stop 0,25 M ácido sulfúrico	15 mL listo para uso tapa amarilla
0 – 4 [CAL]	Calibradores (suero diluido) Konz.: 1, 10, 30, 100, 300 U/mL	1 mL cada listo para uso
P [CONTROL +]	Control positivo (suero diluido) conc.: ver folleto adjunto	1 mL listo para uso tapa roja
N [CONTROL –]	Control negativo (suero diluido) conc.: ver folleto adjunto	1 mL listo para uso tapa verde

4.1 Materiales requeridos

- micropipeta (100 - 1000 µL y 10 - 100 µL) con puntas plásticas
- peine de lavado de 8 canales con una bomba de vacío y una botella de descarte o una lavadora de microplaca
- lector de microplaca con filtros ópticos para 450 nm y 620/690 nm
- tubos, 2 mL
- agua destilada o desionizada

4.2 Presentación y conservación

Anti-LKM-1 se ha diseñado para 96 determinaciones.

La fecha de caducidad de cada uno de los componentes se indica en su etiqueta respectiva, y la del kit completo en la etiqueta externa del empaque.

A su recepción todos los componentes del kit deben conservarse entre 2 °C - 8 °C, preferiblemente en su envase original.

Después de abierto, todos los componentes del kit son estables por lo menos durante 2 meses, bajo condiciones apropiadas de almacenamiento.

4.3 Preparación antes del uso

La **micro-placa** viene sellada al vacío en una bolsa de aluminio con desecante. La placa está formada por el soporte y las tiras de pocillos divisibles. El empaque con la placa debe alcanzar la temperatura ambiente antes de ser abierto. Los pocillos que no se vayan a utilizar deben guardarse refrigerados y protegidos de la humedad en su bolsa original debidamente cerrada.

Se debe preparar una cantidad suficiente de **diluyente de muestra** diluyendo la diluyente de muestra concentrada **5 veces** (1 + 4) con agua desionizada o destilada.

Por ejemplo, diluir 2 mL del concentrado con 8 mL de agua destilada.

Por muestra del paciente se necesita 1 mL de tampón de muestra diluida.

La diluyente de muestra así preparada es estable a 2 °C - 8 °C hasta por 30 días.

Se debe preparar una cantidad suficiente de **solución de lavado** diluyendo la solución de lavado concentrada **10 veces** (1 + 9) con agua desionizada o destilada.

Por ejemplo, diluir 5 mL del concentrado con 45 mL de agua destilada.

La solución de lavado así preparada es estable a 2 °C - 8 °C hasta por 30 días.

Debe asegurarse de que el tiempo de lavado con el tampón en los pocillos sea de al menos 5 segundos en cada uno de los ciclos.

Evitar la exposición a la luz de la solución de sustrato TMB!!

5 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- o **Diluir el suero del paciente con diluyente de la muestra (elaborada a partir de C) 1 + 100 (v/v), e.j. 10 µL suero + 1.0 mL diluyente de la muestra (elaborada a partir de C).**
- o **Evitar la variación de tiempo durante el pipeteo de los reactivos y las muestras.**

1. Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) antes del uso. Mezclar suavemente sin causar espuma.
2. Dispensar en los pocillos respectivos
 - 100 µL** calibradores 0 - 4
 - 100 µL** controles positivo y negativo
 - 100 µL** muestra diluida del paciente.
3. Incubar **60 min** a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
4. Decantar, luego lavar cada pocillo **tres veces** utilizando **300 µL** de solución de lavado (elaborada a partir de B).
5. Agregar **100 µL** de solución de conjugado (D) a cada pocillo.
6. Incubar **30 min** a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
7. Decantar, luego lavar cada pocillo **tres veces** utilizando **300 µL** de solución de lavado (elaborada a partir de B).
8. Agregar **100 µL** de sustrato (E) a cada pocillo.
9. Incubar **15 min protegiendo de la luz** a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
10. Agregar **100 µL** de solución stop (F) a cada pocillo y mezclar suavemente.
11. Leer la DO a **450 nm** versus 620 o 690 nm dentro de **30 min** luego de agregada la solución stop.

6 PROCESAMIENTO DE DATOS

La curva estándar se establece situando la media de los valores de la DO de los calibradores 0 - 4 en el eje de las ordenadas (eje y, escala lineal), frente a las concentraciones respectivas de anticuerpos anti-LKM-1 en el eje de las abscisas (eje x, escala logarítmica).

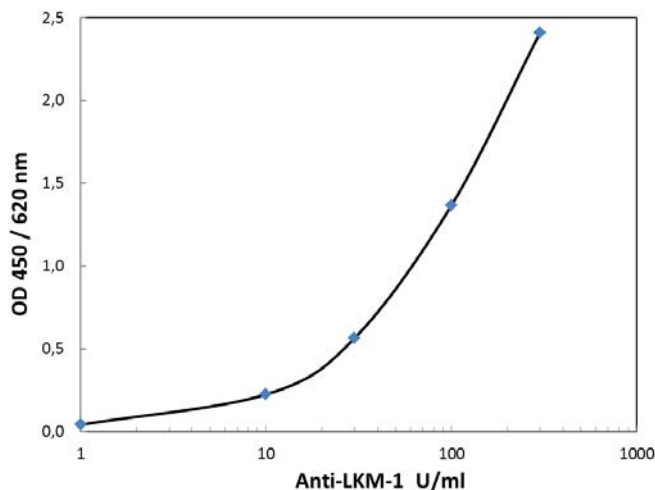
La concentración de anticuerpos Anti- anti-LKM-1 en las muestras se obtiene directamente por extrapolación en U/mL a partir de los valores obtenidos de DO.

Si se utiliza la dilución recomendada para las muestras de suero de los pacientes de 1 + 100 (v/v) y si el resto de los reactivos se suministran de acuerdo a estos volúmenes, entonces no se requiere un factor de corrección.

6.1 Ejemplo de resultados de ensayos típicos

Pocillo	DO (a)	DO (b)	DO (promedio)	U/mL
Calibrador 0	0,037	0,044	0,041	1
Calibrador 1	0,221	0,226	0,224	10
Calibrador 2	0,568	0,560	0,564	30
Calibrador 3	1,406	1,328	1,367	100
Calibrador 4	2,296	2,186	2,241	300
Paciente 1	0,960	0,967	0,964	60

CURVA ESTÁNDAR TÍPICA



No usar para interpretación de resultados!

Las muestras con DO > que el calibrador 4, deben ser diluidas con diluyente de muestra y evaluadas nuevamente. Los resultados deben ser multiplicados por el factor de dilución elegido.

6.2 Validez del test

El test corrido es válido si:

- o el promedio de DO del calibrador 4 es $\geq 1,2$
- o para la concentración de Control P ver el folleto incluido
- o Control N es negativo

Si los criterios de calidad mencionados arriba no son alcanzados, repetir el test y asegurarse de que el procedimiento del test es seguido correctamente (tiempos de incubación y temperaturas, dilución de la muestra y del buffer de lavado, etapas de lavado, etc.) En caso de fallas repetidas del criterio de calidad contacte su proveedor.

7 VALORES DE REFERENCIA

Anticuerpos LKM-1	U/mL
Positivo	> 15
Negativo	≤ 15

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de referencia normales y patológicos para los niveles de anticuerpos anti-LKM-1 séricos, tal y como se acostumbra para otros parámetros de diagnóstico. En consecuencia, los valores de referencia aquí dados deben considerarse únicamente como una guía en cuanto a los valores que pueden esperarse del ensayo.

7.1 Limitaciones del Método

Muestras de individuos sanos, deberán resultar negativas para el ensayo con anti-LKM-1; sin embargo individuos aparentemente sanos pueden mostrar un resultado positivo a la presencia de anticuerpos anti-LKM-1.

Ningún diagnóstico clínico debe basarse únicamente en los resultados de un método para diagnóstico in vitro. El personal médico deberá considerar todos los resultados clínicos y de laboratorio para establecer un diagnóstico

8 DATOS CARACTERISTICOS DEL ENSAYO

8.1 Calibración

No hay disponible material de referencia internacional para éste parámetro por lo cual el ensayo se calibra en unidades arbitrarias U/mL.

8.2 Linealidad

Muestras seleccionadas de sueros positivos han sido analizadas con este ensayo y se ha encontrado que se diluyen linealmente. Sin embargo, debido a la naturaleza heterogénea de los autoanticuerpos humanos podría haber sueros que no siguen este comportamiento.

8.3 Sensibilidad

La sensibilidad analítica de este ensayo ha sido determinada en 1 U/mL.

8.4 Especificidad

No se ha encontrado reactividad cruzada con otros autoantígenos

8.5 Precisión

Coefficiente de Variación intraensayo

Muestra	Promedio U/mL	Desviación estándar	CV (%)
1	182,5	6,4	3,5
2	61,8	2,1	3,5
3	19,6	0,6	3,1
4	5,1	0,4	8,1

Coefficiente de Variación interensayo

Muestra	Promedio U/mL	Desviación estándar	CV (%)
1	190,1	6,7	3,5
2	63,8	1,4	2,3
3	19,7	0,2	1,2
4	5,4	0,1	2,2

9 PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- o **Este kit es para uso in vitro solamente.** Seguir las instrucciones de trabajo cuidadosamente. DRG y sus distribuidores autorizados no serán responsables por los daños indirecta o consecuentemente ocasionados por cambiar o modificar el procedimiento indicado. El kit debería ser llevado a cabo solamente por personal técnico entrenado.
- o Las fechas de expiración establecidas en las etiquetas respectivas son para ser observadas. Lo mismo en relación a la estabilidad establecida para los reactivos reconstituidos.
- o No usar o mezclar reactivos de lotes diferentes.
- o No usar reactivos de otros fabricantes
- o Evitar la variación de tiempo durante el pipeteo de los reactivos
- o Todos los reactivos deben mantenerse a 2 °C - 8 °C antes del uso en el contenedor de embarque original.
- o Algunos de los reactivos contienen pequeñas cantidades de Neolone M10 ($\leq 0.05\%$) como conservante. No deben ser ingeridos o permitir el contacto con la piel o mucosas.
- o Las fuentes materiales derivadas de fluidos del cuerpo humano u órganos utilizados en la preparación de este kit fueron ensayados y se encontraron negativos para HBsAg y HIV así como para anticuerpos HCV. Sin embargo, ningún test conocido garantiza la ausencia de tales agentes virales. Por lo tanto, manipular todos los componentes y todas las muestras de pacientes como si fueran potencialmente peligrosas.
- o Dado que el kit contiene materiales potencialmente peligrosos, deben observarse las siguientes precauciones:
 - No fumar, comer o beber mientras se manipule el material del kit,
 - Siempre utilizar guantes protectores,
 - Nunca pipetear el material con la boca,
 - Enjuagar los derrames prontamente, lavando la totalidad de la superficie afectada con un decontaminante

1 INTRODUCTION

La trousse anti-LKM-1 est destinée au dosage des anticorps anti- microsomes du foie et du rein de type 1 (liver-kidney microsomes, LKM-1) dans le sérum ou le plasma humain, en vue du diagnostic biologique d'une hépatite auto-immune.

Le groupe de maladies auto-immunes du foie primaires (PAL) comprend l'hépatite auto-immune (HAI), la cirrhose biliaire primitive (CBP) et la cholangite sclérosante primitive (PSC).

Le tableau clinique des PAL, dans la plupart des cas, n'est pas différent de celui des autres maladies chroniques du foie. Les maladies hépatiques chroniques ont une pathogénèse auto-immune dans environ 15% des cas. C'est pourquoi, après avoir exclu une étiologie infectieuse et plus particulièrement virale, le dosage de différents auto-anticorps est recommandé.

Chez les patients atteints de HAI, différents autoanticorps peuvent être dosés. Compte tenu du nombre d'autoanticorps connu aujourd'hui, une subdivision des hépatites auto-immunes en 3 sous-groupes peut être envisagée. Le type I se caractérise par la présence d'anticorps antinucléaires (ANA) et d'anticorps contre les muscles lisses (ASMA). Ces derniers reconnaissent la structure antigénique formée par l'actine polymérisée en F-actine. Le type II se caractérise par la présence d'anticorps contre les microsomes hépatiques et rénaux (LKM-1). Ces derniers ont pour antigène cible, le cytochrome P450 IID6. Les anticorps anti-LC1 sont aussi spécifiques du type II. Ces derniers ont pour cible antigénique la formiminotransferase cyclodéaminase localisée dans le cytosole des cellules hépatiques.

Les sérums de patients atteints d'hépatite auto-immune du type III présentent des anticorps contre les antigènes solubles du foie (SLA). Le "Groupe international contre l'hépatite", n'a cependant pas encore complètement accepté ce type en tant que subdivision indépendante des hépatites auto-immunes.

La présence de LKM-1 associé HAI type II est principalement observée chez les filles âgées de 2 ans à 14 ans. La détection d'anticorps contre LKM-1 est donc notamment importante en pédiatrie.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis.
Semin Liver Dis (1987) 4: 1 - 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group.
Hepatology (1993) 18: 998 - 1005

Manns MP et al.: LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in p450 IID6, a cytochrome p-450 monooxygenase.
J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 PRINCIPE DU TEST

La trousse anti-LKM-I est un dosage immuno-enzymatique pour la détermination quantitative des IgG anticorps contre la cytochrome p450 IID6 dans le sérum ou le plasma humain.

Les anticorps présents dans les calibrateurs, le contrôle et les échantillons dilués réagissent avec la cytochrome p450 IID6 humaine recombinante immobilisée sur des microcupules en polystyrène. Au cours d'une première incubation de 60 minutes à température ambiante, les composants du sérum non fixés sont éliminés par lavage.

Les anticorps fixés réagissent spécifiquement avec une anti-IgG humaines conjugué à la peroxydase de raifort lors d'une période d'incubation de 30 minutes à température ambiante.

Au terme de cette seconde incubation, l'excès de conjugué est éliminé par lavage, puis la présence de l'enzyme est révélée par un substrat chromogène (TMB). La peroxydase convertit le substrat TMB incolore en bleu. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout dans chaque puits de la solution acide après 15 minutes à température ambiante, changeant la solution du bleu au jaune.

La densité optique de l'échantillon est déterminée par lecture à 450 nm est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiquement fixée. La courbe de calibration est établie en reportant les concentrations connues des standards et les valeurs de DO correspondantes mesurées en anticorps anti-LKM-I. La concentration en anticorps de l'échantillon est directement lue sur la courbe de calibration.

3 ECHANTILLONS DES PATIENTS

3.1 Prélèvement et conservation des échantillons

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Le plasma peut aussi être utilisé avec le kit.

Les échantillons hémolysés, lipémiques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 3 jours entre 2 °C - 8 °C. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à -20 °C.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons avant congélation.

3.2 Préparation avant utilisation

Laisser les échantillons atteindre la température ambiante.

Prendre soin d'agiter les échantillons de sérum pour obtenir une certaine homogénéité.

Note : Les échantillons doivent être dilués au **1/100** (v/v) avant de débiter le dosage, soit **10 µL d'échantillon + 1 mL de diluant** (prepare en C).

4 COMPOSITION

Pour 96 déterminations.

A [Ag 96]	Microplaque, 12 barrettes sécables de 8 puits revêtus avec du cytochrome p450 IID6 humaine recombinante.	1 plaque scellée sous vide avec dessiccateur
B [BUF WASH 10X]	Tampon de lavage 10x Concentré pour l'obtention de 1000 mL de solution de lavage.	100 mL Concentré Bouchon blanc
C [DIL 5X]	Diluant échantillon 5x Concentré pour l'obtention de 100 mL de solution de diluent	20 mL Concentré Bouchon noir
D [CONJ G]	Conjugué Contient des anti-IgG humaines (chèvre) couplés à la peroxydase HRP.	15 mL Prêt à l'emploi Bouchon rouge
E [SOLN TMB]	Substrat 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine dans du tampon citrate contenant du peroxyde d'hydrogène	15 mL Prêt à l'emploi Bouchon bleu
F [H2SO4 0.25 M]	Solution d'arrêt 0.25 M acide sulfurique	15 mL Prêt à l'emploi Bouchon jaune
0 – 4 [CAL]	Calibrateurs (sérum dilués) Concentrations 1, 10, 30, 100, 300 U/mL	1 mL chacun Prêt à l'emploi
P [CONTROL +]	Contrôle positif (sérum dilué) Concentration: voir feuillet dans le coffret	1 mL Prêt à l'emploi Bouchon rouge
N [CONTROL –]	Contrôle négatif (sérum dilué) Concentration: voir feuillet dans le coffret	1 mL Prêt à l'emploi Bouchon vert

4.1 Matériels non fournis

- micropipette (100 - 1000 µL et 10 - 100 µL) avec pointes en plastique à usage unique
- peigne de lavage à 8 canaux avec pompe à vide ou laveur de microplaques
- lecteur de microplaque avec filtres optiques 450 nm, 620 nm ou 690 nm
- éprouvettes, 2 mL
- eau distillée ou déionisée

4.2 Format et conservation

La trousse anti-LKM-1 a été conçue pour 96 déterminations.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants de la trousse doivent être conservés à 2 °C - 8 °C, de préférence dans l'emballage d'origine.

Après ouverture, tous les composants sont stables au moins 2 mois dans les conditions appropriées de stockage.

4.3 Préparation avant l'emploi

La **plaque de microtitration** est scellée sous vide avec un dessiccateur. La plaque est composée d'un cadre et de barrettes de cupules sécables. Porter la plaque à température ambiante avant d'ouvrir son emballage. Les cupules inutilisées doivent être conservées à 2 °C - 8 °C et remplacées dans l'emballage d'origine pour les protéger de l'humidité.

Préparer une quantité suffisante de **diluant échantillon**

en diluant concentré 5x (1+4) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée.

Par exemple, diluer 2 mL du concentré avec 8 mL d'eau distillé.

Par échantillon de patient 1 mL tampon échantillon dilué est nécessaire.

Le diluant échantillon diluée est stable à 2 °C - 8 °C pendant 30 jours.

Préparer une quantité suffisante de **solution de lavage**

en diluant le tampon concentré 10x (1+9) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée.

Par exemple, diluer 5 mL du concentré avec 45 mL d'eau distillé, QSP par barrette.

La solution de lavage diluée est stable à 2 °C - 8 °C pendant 30 jours.

Veiller à ce que le temps de contact de la solution de lavage dans les cupules soit d'au moins 5 secondes par cycle de lavage.

Eviter d'exposer le substrat à la lumière.

5 PROTOCOLE DE DOSAGE

- o **Diluer les sérums des patients avec le diluant des échantillons (prepare en C) au 1/100 (v/v); exemple 10 µL + 1,0 mL de diluant des échantillons (prepare en C).**
 - o **Une fois l'analyse commencée, toutes les étapes doivent être menées à leur terme sans interruption, en respectant les temps d'incubation prescrits.**
1. Porter tous les réactifs à température ambiante (18 °C - 25 °C) et mélanger doucement en évitant la formation de mousse.
 2. Pipeter
 - 100 µL** de calibrateurs 0 - 4
 - 100 µL** sérum de contrôle positif (P) et négatif (N)
 - 100 µL** des échantillons dilués des patients dans les puits respectifs
 3. Incuber **60 minutes** à température (18 °C - 25 °C)
 4. Décanter. Laver chaque cupule **3 fois** avec **300 µL** de solution de lavage (préparée en B).
 5. Ajouter **100 µL** de conjugué (**D**) à chaque cupule
 6. Incuber **30 minutes** à température ambiante (18 °C - 25 °C)
 7. Décanter. Laver chaque cupule **3 fois** avec **300 µL** de solution de lavage (préparée en B).
 8. Ajouter **100 µL** de substrat (**E**) à chaque cupule.
 9. Incuber **15 minutes à l'abri de la lumière** à température ambiante (18 °C - 25 °C)
 10. Ajouter **100 µL** de solution d'arrêt (**F**) à chaque cupule et mélanger doucement.
 11. Lire les densités optiques à 450 nm contre 620 ou 690 nm dans les 30 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt.

6 CALCUL DES RÉSULTATS

La courbe d'étalonnage est établie en reportant en ordonnée axe des Y ((lin. scale) les DO des calibrateurs 0 - 4 et leurs concentrations anti-LKM-1 en abscisse axe des X (log. scale).

Les concentrations en anti-LKM-1 des échantillons sont directement lues en U/mL en fonction de leur valeur de DO.

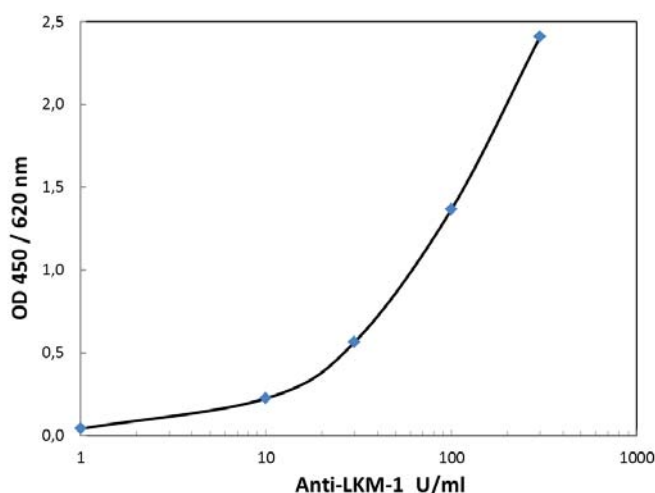
En utilisant la dilution recommandée de 1 + 100 (v / v) pour les échantillons des patients, aucun facteur de multiplication pour la détermination de la concentration est nécessaire parce que les calibrateurs sont dilués en conséquence.

L'évaluation des anti-LKM-1 peuvent être réalisées également grâce à un logiciel d'ordinateur intégré au photomètre.

6.1 Exemples de courbe d'étalonnage

Echantillon	DO (a)	DO (b)	DO (Moyenne)	U/mL
Calibrateur 0	0,037	0,044	0,041	1
Calibrateur 1	0,221	0,226	0,224	10
Calibrateur 2	0,568	0,560	0,564	30
Calibrateur 3	1,406	1,328	1,367	100
Calibrateur 4	2,296	2,186	2,241	300
Patient 1	0,960	0,967	0,964	60

COURBES STANDARD TYPQUES



Ne pas utiliser cet exemple pour interpréter les résultats !

Les échantillons présentant un DO > calibrateur 4 doivent être dilués avec diluant échantillon et doit être retester. Les résultats sont multipliés par le facteur de dilution choisi.

6.2 Validité des tests

Le test est valide si:

- o la moyenne de DO du calibrateur 4 est $\geq$ à 1,2
- o pour la concentration de contrôle P voir la notice jointe
- o contrôle N est négatif

Si ces critères de qualité ne sont pas remplis, répéter le test et assurez-vous que la procédure du test est correctement respectée (temps d'incubation, température, dilution du tampon de lavage et de l'échantillon, étapes de lavages etc.).

Si les critères de validité, même après l'approche de tests répétée ne sont pas remplies, s'il vous plaît contacter le fabricant.

7 VALEURS DE REFERENCE

Anti-LKM-1	U/mL
Positif	> 15
Négatif	≤ 15

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif.

7.1 Limites du test

Les patients sains doivent être négatifs en utilisant le coffret anti-LKM-1. Toutefois, on peut observer un résultat positif chez certaines personnes apparemment saines.

Tout diagnostic ne doit pas être basé sur le seul résultat de la biologie, le médecin devant prendre en compte l'ensemble des aspects cliniques et biologiques

8 DONNEES ANALYTIQUES

8.1 Calibration

Aucun matériel de référence international n'est disponible pour ce paramètre, le test est de ce fait calibré en unités arbitraires U/mL.

8.2 Linéarité

Les échantillons de sérum positifs sélectionnés ont été testés par ce réactif et se sont trouvés linéairement après dilution. Toutefois, en raison de la nature hétérogène des auto-anticorps humains il pourrait y avoir des sérums qui ne suivent pas cette règle.

8.3 Sensibilité

La sensibilité analytique de ce dosage a été déterminée à 1,0 U/mL.

8.4 Spécificité

Aucune réactivité croisée à d'autres auto-antigènes n'a été trouvée.

8.5 Précision

Coefficient de variation intra-dosage (CV)

Echantillon	Moyenne (U/mL)	écart-type	CV (%)
1	182,5	6,4	3,5
2	61,8	2,1	3,5
3	19,6	0,6	3,1
4	5,1	0,4	8,1

Coefficient de variation inter-dosage (CV)

Echantillon	Moyenne (U/mL)	écart-type	CV (%)
1	190,1	6,7	3,5
2	63,8	1,4	2,3
3	19,7	0,2	1,2
4	5,4	0,1	2,2

9 PRECAUTIONS D'EMPLOI

- o **Ce coffret est destiné uniquement à un usage in vitro.** Suivre attentivement les instructions d'utilisation. DRG et ses distributeurs agréés ne seraient être tenus responsables des dommages directement ou indirectement liés à une modification de la procédure indiquée. Le kit doit être utilisé par du personnel technique qualifié seulement.
- o Les dates d'expiration sur les différentes étiquettes doivent être respectées, ainsi que les délais de conservation des réactifs après reconstitution.
- o Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- o Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- o Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- o Tous les réactifs doivent être stockés à 2 °C - 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
- o Eviter tout contact de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) avec la peau et les muqueuses. En cas d'éclaboussures, laver immédiatement à l'eau.
- o Certains des réactifs contiennent de faibles quantités de Neolone M10 ($\leq 0.05\%$) comme conservateur. Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
- o Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l'antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l'absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
- o Puisque le kit contient des matières potentiellement dangereuses, les précautions suivantes doivent être respectées :
 - Ne pas fumer, ne pas manger ou ne pas boire lors de la manipulation des réactifs,
 - Porter systématiquement des gants de protection,
 - Ne jamais pipeter à la bouche,
 - Essuyer rapidement le liquide renversé, en lavant la surface affectée avec un décontaminant.

1 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O anti-LKM-1 é um conjunto de reagentes para a análise quantitativa de anticorpos IgG contra o citocromo P450 IID6 no soro ou plasma humano, usado para diagnosticar a hepatite autoimune (HAI).

O grupo das doenças hepáticas autoimunes primárias (DEAP) inclui a hepatite autoimune (HAI), a cirrose biliar primária (CBP) e a colangite esclerosante primária (CEP). O quadro clínico das DEAP, na maioria dos casos, não é diferente do das outras doenças hepáticas crônicas. Aprox. 15% dos casos com doenças hepáticas crônicas apresentam uma patogênese autoimune. Por isso, para o diagnóstico diferencial das DEAP, após a exclusão de uma etiopatogênese infecciosa, em particular de infecções virais, é utilizada, principalmente, a análise das diferentes especificidades dos autoanticorpos.

Nos doentes com uma HAI, podem ser analisadas várias reatividades dos autoanticorpos. Com base no elevado número de autoanticorpos conhecidos hoje em dia, é discutida uma subdivisão da hepatite autoimune em 3 subgrupos.

Característico do tipo I é a detecção de anticorpos antinucleares (ANA) e de anticorpos antimúsculo liso (ASMA). Os ASMA reconhecem estruturas antigénicas que são formadas pelo polímero actina F. Em contrapartida, no tipo II, são encontrados anticorpos antimicrosossomais do fígado e rim (anticorpos LKM-1), cujo antígeno alvo é o citocromo P450 IID6. Também específicos para o tipo II são os anticorpos LC1, que reconhecem a enzima hepática formiminotransferase ciclodeaminase, detetável no citosol. Os soros dos doentes com hepatite autoimune do tipo III apresentam apenas anticorpos contra o antígeno solúvel hepático (anticorpos SLA). No entanto, o "International Hepatitis Group" aceitou este subtipo de hepatite autoimune, apenas provisoriamente, como um quadro clínico independente.

A HAI tipo II associada ao LKM-1 ocorre predominantemente em meninas com idades entre os 2 e os 14 anos. Por este motivo, a análise de anticorpos anti-LKM-1 é muito importante para a pediatria.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis.

Semin Liver Dis (1987) 4: 1 - 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group.

Hepatology (1993) 18: 998 - 1005

Manns MP et al.: LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in p450 IID6, a cytochrome p-450 monooxygenase.

J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 PRINCÍPIO DO TESTE

O anti-LKM-1 é um conjunto de reagentes para a análise quantitativa de anticorpos IgG contra o citocromo P450 IID6 no soro ou plasma humano.

Na primeira fase de reação, os anticorpos LKM-1 nos padrões, no controlo positivo e nas amostras diluídas reagem com o citocromo P450 IID6 recombinante, ligado na fase sólida. Os componentes séricos não ligados são removidos com uma lavagem, após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente (TA).

Na segunda fase de reação, os anticorpos ligados reagem especificamente com IgG anti-humano que está acoplado com peroxidase de rábano (POD). Após 30 minutos de incubação à TA, as moléculas conjugadas excedentes são separadas, com uma lavagem, dos imunocomplexos ligados na fase sólida.

Na seguinte fase de reação enzimática, a POD converte a solução de substrato incolor com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) num produto final azul. Esta reação é interrompida após 15 minutos de incubação, pela adição de uma solução stop ácida, através da qual se dá uma mudança de cor na solução, de azul para amarelo.

A densidade ótica (DO) do produto final medida a 450 nm é diretamente proporcional à concentração dos anticorpos especificamente ligados. Com os valores de DO dos padrões determinados e as suas respectivas concentrações de anticorpos, é criada uma curva de calibração. Os valores do doente desconhecidos são lidos diretamente a partir desta curva de calibração.

3 AMOSTRAS DE DOENTES

3.1 Recolha e armazenamento

Recolher sangue por punção venosa, deixar coagular e isolar o soro através de centrifugação. O plasma também pode ser utilizado.

Amostras lipémicas, hemolisadas ou contaminadas não podem ser utilizadas.

É possível armazenar as amostras até 3 dias a 2 °C - 8 °C. Além disso, as amostras têm de ser congeladas a - 20 °C.

Deve evitar-se o congelamento e descongelamento repetidos, se necessário, dividir em alíquotas antes do congelamento.

3.2 Preparação e utilização

Antes da utilização no anti-LKM-1, as amostras são colocadas à temperatura ambiente.

Em princípio, deve agitar-se durante alguns segundos para assegurar uma homogeneidade apropriada.

Atenção:

Antes da utilização no teste, as amostras têm de ser diluídas **1 + 100** (v/v),

por exemplo, **10 µL de amostra + 1,0 mL de diluente de amostras (diluído a partir de C)**

4 COMPONENTES DO TESTE

Para 96 determinações.

A [Ag 96]	Placa de microtitulação, 12 tiras destacáveis por 8 poços revestidos com citocromo P450 IID6 recombinante humano	1 selada por vácuo com saco de exsicante
B [BUF WASH 10X]	Tampão de lavagem concentrado, 10X para 1000 mL de solução	100 mL concentrado com tampa preta
C [DIL 5X]	Diluente de amostra concentrado, 5X para 100 mL de solução	20 mL concentrado com tampa negra
D [CONJ G]	Conjugado contém IgG anti-humano (cabra), acoplado com POD	15 mL pronto a usar com tampa vermelha
E [SOLN TMB]	Substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em tampão citrato com peróxido de hidrogénio	15 mL pronto a usar com tampa azul
F [H2SO4 0.25 M]	Solução de paragem ácido sulfúrico 0,25 M	15 mL pronta a usar com tampa amarela
0 – 4 [CAL]	Padrões (Calibradores) (soro diluído) conc.: 1, 10, 30, 100, 300 U/mL	1 mL cada prontos a usar
P [CONTROL +]	Controlo positivo (soro diluído) Concent.: consultar o folheto	1 mL pronto a usar com tampa vermelha
N [CONTROL -]	Controlo negativo (soro diluído) Concent.: consultar o folheto	1 mL pronto a usar com tampa verde

4.1 Materiais necessários

- Micropipetas (10 - 100 µL e 100 - 1000 µL) com pontas
- Lavadora manual de 8 canais com bomba a vácuo e recipientes para resíduos ou dispositivo de lavagem de placas de microtitulação.
- Fotómetro de placas de microtitulação com filtro ótico para 450 nm e 620 nm ou 690 nm
- tubinho para diluição de amostras, 2 mL
- Água desionizada ou destilada

4.2 Quantidade e armazenamento

Cada embalagem de anti-LKM-1 contém os reagentes para 96 análises.

O prazo de validade do conjunto completo de reagentes está especificado na etiqueta exterior do kit de teste. Se for necessário, os prazos de validade de cada reagente podem ser mais longos e estão indicados nos respetivos reagentes.

Até à sua utilização, todos os reagentes do anti-LKM-1 devem ser armazenados a 2 °C - 8 °C.

Depois de abertos, todos os componentes do kit de teste conservam-se, pelo menos, 2 meses, se armazenados adequadamente a 2 °C - 8 °C.

4.3 Preparação e utilização

A **placa de microtitulação** com tiras quebráveis está selada a vácuo dentro de um saco revestido a alumínio juntamente com um exsicante. Abrir a embalagem só depois de atingir a temperatura ambiente. Proteger da humidade os poços não utilizados e colocar novamente dentro do saco, juntamente com o exsicante.

Diluir o **concentrado de diluente de amostras** 1:5 (1 + 4) com água destilada ou desionizada.

Exemplo: 2 mL de concentrado + 8 mL de água destilada,
por amostra é necessário 1 mL de tampão de amostra diluído (ver acima).

Diluir o **concentrado de solução de lavagem** 1:10 (1 + 9) com água destilada ou desionizada.

Exemplo: 5 mL de concentrado de solução de lavagem + 45 mL de água destilada por tira.

As soluções diluídas desta forma conservam-se aprox. 30 dias, armazenadas a 2 °C - 8 °C.

No processo de lavagem, deixar a solução de lavagem aplicada atuar durante, pelo menos, 5 segundos e remover os resíduos da solução dos poços, aspirando ou sacudindo bem.

Manter o substrato protegido da luz.

5 EXECUÇÃO DO TESTE

- o **Diluir previamente as amostras 1 + 100 (v/v)**
p. ex. 10 µL de soro + 1,0 mL de diluente de amostras (a partir de C)
 - o **Respeitar a sequência dos passos de pipetagem e os tempos indicados para a sua execução.**
1. Colocar os reagentes e os poços necessários para o teste à temperatura ambiente (TA) (18 °C - 25 °C) e agitar todos os reagentes antes da utilização.
 2. Pipetar
100 µL de padrões (0 - 4),
100 µL de controlos (P) e (N),
100 µL dos soros do doente diluídos **1 + 100**
nos respetivos poços.
 3. Incubar **60 minutos** à TA (18 °C - 25 °C).
 4. Decantar e lavar **3 vezes** com **300 µL** de solução de lavagem (diluída a partir de B)
 5. Pipetar **100 µL** de conjugado (D) em cada poço.
 6. Incubar **30 minutos** à TA (18 °C - 25 °C).
 7. Decantar e lavar **3 vezes** com **300 µL** de solução de lavagem (diluída a partir de B)
 8. Pipetar **100 µL** de substrato (E) em cada poço.
 9. Incubar **15 minutos** à TA (18 °C - 25 °C) **no escuro**.
 10. Pipetar **100 µL** de solução stop (F) em cada poço e agitar um pouco.
 11. Medir a DO a **450 nm** em relação a 620 (690) nm com um fotómetro de placas de microtitulação no prazo de 30 minutos.

6 CÁLCULO DOS RESULTADOS

Os valores médios de DO (VM) dos padrões 0 - 4 são representados nas ordenadas (lin.) relativamente às respetivas concentrações de anticorpos LKM-1 (U/mL) (abscissas, escala lógica).

Com estes dados é desenhada uma curva de calibração, na qual é possível ler diretamente as respetivas concentrações de anticorpos anti-LKM-1 das amostras diluídas desconhecidas, a partir dos valores médios da DO.

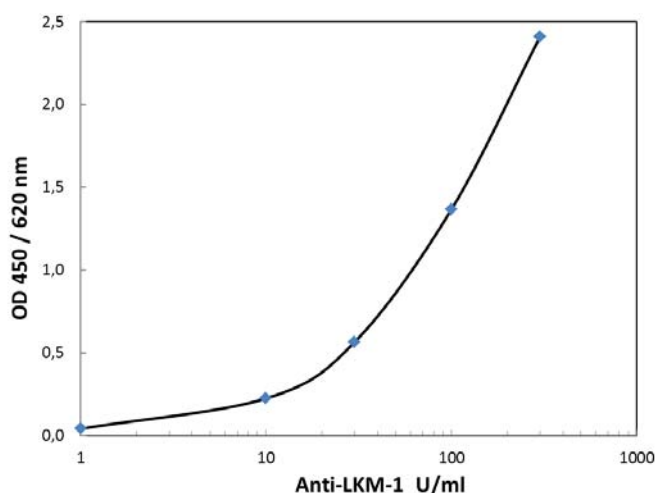
Desde que seja aplicada a diluição da amostra 1 + 100 acima especificada, não é necessário qualquer fator de multiplicação para determinar a concentração dos anticorpos LKM-1, uma vez que os padrões já estão presentes nesta diluição.

Esta avaliação pode também ser efetuada automaticamente pela unidade de avaliação integrada do fotómetro de placas de microtitulação.

6.1 Exemplo de cálculo

Amostra	DO (a)	DO (b)	DO (VM)	U/mL
Padrão 0	0,037	0,044	0,041	1
Padrão 1	0,221	0,226	0,224	10
Padrão 2	0,568	0,560	0,564	30
Padrão 3	1,406	1,328	1,367	100
Padrão 4	2,296	2,186	2,241	300
Doente 1	0,960	0,967	0,964	60

CURVA DE CALIBRAÇÃO TÍPICA



Este exemplo não pode ser utilizado para o cálculo dos valores dos doentes.

Em amostras cujos valores de DO ultrapassem a DO do calibrador 4, a análise tem de ser repetida com uma diluição prévia mais elevada da amostra (em diluente de amostras). O fator de diluição correspondente tem de ser tido em conta no cálculo dos resultados.

6.2 Validação do teste

O teste pode ser avaliado se:

- o O valor médio de DO do padrão 4 $\geq 1,2$
- o O valor determinado para o controlo P se encontrar dentro do intervalo especificado (consultar folheto)
- o O controlo N for negativo

Se estes critérios de validade não forem cumpridos, o teste tem de ser repetido. Certifique-se de que o processamento é realizado estritamente de acordo com as instruções de utilização (preparação correta dos reagentes, tempos e temperaturas de incubação corretos, lavagem cuidadosa). Se os critérios de validade não forem cumpridos, mesmo após a repetição do teste, contacte o fabricante.

7 VALORES DE REFERÊNCIA

Anticorpos LKM-1	U/mL
positivo	> 15
no intervalo normal	≤ 15

Devido a diferenças na população, recomendamos que cada laboratório determine os seus próprios intervalos de referência patológicos e normais para os níveis de autoanticorpos anti-LKM-1. Por isso, os valores acima indicados devem ser considerados apenas como recomendação.

7.1 Limites e métodos

O kit de teste do anti-LKM-1, quando utilizado em indivíduos saudáveis, deve ter um resultado negativo. Os indivíduos assintomáticos poderão, contudo, apresentar autoanticorpos positivos contra o citocromo P450 IID6.

Um diagnóstico clínico não deve basear-se apenas nos resultados de um único método de diagnóstico. Para fazer um diagnóstico, o médico deverá considerar todos os dados clínicos e laboratoriais possíveis.

8 CARACTERÍSTICAS DO TESTE

8.1 Calibração

Na ausência de um padrão de referência internacional, os resultados são dados em unidades arbitrárias de U/mL.

8.2 Paralelismo

Para soros selecionados, foi possível determinar uma relação linear entre a diluição e a concentração de anticorpos medida. Devido à heterogeneidade dos anticorpos humanos, não se exclui a possibilidade de alguns soros apresentarem um comportamento não linear.

8.3 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do anti-LKM-1 foi determinada com 1,0 U/mL.

8.4 Especificidade

Não foram encontradas reatividades cruzadas com outros autoantígenos.

8.5 Precisão

Variância intraensaio

Amostra	VM U/mL	Desvio padrão	CV (%)
1	182,5	6,4	3,5
2	61,8	2,1	3,5
3	19,6	0,6	3,1
4	5,1	0,4	8,1

Variância intraensaio

Amostra	VM U/mL	Desvio padrão	CV (%)
1	190,1	6,7	3,5
2	63,8	1,4	2,3
3	19,7	0,2	1,2
4	5,4	0,1	2,2

9 INFORMAÇÕES GERAIS E MEDIDAS DE PRECAUÇÃO

- o Este conjunto de reagentes destina-se à **utilização in vitro** e deve ser utilizado por técnicos de laboratório qualificados. As instruções de utilização devem ser estritamente cumpridas.
- o O kit de teste ou os seus reagentes abertos só podem ser utilizados dentro dos prazos de validade especificados.
- o Não é permitido misturar componentes de diferentes lotes.
- o O mesmo se aplica à utilização de reagentes de outros fabricantes para complementar o kit de teste aberto.
- o Até à sua reutilização, a temperatura de armazenamento recomendada para os reagentes abertos é de 2 °C - 8 °C.
- o Alguns reagentes contêm pequenas quantidades de Neolone M10 ($\leq 0,05\%$) como conservante. Não engolir os reagentes e evitar o contacto com as mucosas.
- o Todos os reagentes deste kit de teste, que são de origem humana, revelaram um resultado negativo para HBsAg (antigénio de superfície da hepatite B) ou anticorpos contra o VIH (vírus da imunodeficiência humana) e o VHC (vírus da hepatite C). No entanto, a presença de agentes infecciosos não pode ser excluída com certeza absoluta por nenhum teste. Por isso, os reagentes devem ser sempre tratados como material potencialmente infeccioso.
- o Ao manipular os componentes do kit de teste, bem como as amostras e os controlos, observar as normas de prevenção de acidentes durante o manuseamento de materiais potencialmente infecciosos e produtos químicos perigosos. Em particular, devem ser respeitadas as seguintes regras:
 - Não comer, beber ou fumar!
 - Nunca pipetar soluções com a boca!
 - Usar luvas para evitar o contacto com os reagentes e os soros!
 - Observar as indicações de segurança de cada um dos componentes do teste!
- o Recomendamos que realize os seus próprios controlos de qualidade, utilizando soros de controlo internos do laboratório (ver também Eichordnung, Bundesgesetzblatt I, pág. 1657, 1988, bem como as diretrizes da Associação Médica Alemã sobre o controlo de qualidade de testes de laboratório médico quantitativos, Dt. Ärzteblatt 98, fasc. 42, pág. A2747-59, 2001).

1 UTILIZARE

Anti-LKM-1 este un set de reactivi pentru determinarea cantitativă a anticorpilor IgG anticitocrom p450 IID6 în serul uman sau în plasma umană pentru diagnosticarea hepatitei autoimune (HAI).

Spectrul de boli hepatice primare autoimune (PAL) cuprinde hepatita autoimună (HAI), ciroza biliară primitivă (CBP) și colangita sclerozantă primitivă (CSP). În cele mai multe cazuri, simptomele PAL nu diferă fundamental de alte boli cronice ale ficatului. Circa 15% dintre cazurile de boli hepatice cronice prezintă o patogeneză autoimună. De aceea, după excluderea unei etiopatogenii infecțioase, în mod special a infecțiilor virale, se utilizează pentru diagnosticul diferențial al PAL în primul rând determinarea diferitelor caracteristici ale diferiților autoanticorpi.

La pacienții cu HAI pot fi determinate diferite activități ale autoanticorpilor. Prin numărul mare de anticorpi cunoscuți în ziua de astăzi, se poate vorbi despre o clasificare a HAI în trei subgrupe. Caracteristic pentru primul tip este prezența anticorpilor antinucleari (ANA) și a anticorpilor împotriva musculaturii netede (ASMA). ASMA identifică structuri antigene produse prin actina polimerizată filamentosă (F). Prin contrast, la tipul al II-lea au fost găsiți anticorpi antimicrozomi hepato-renali (anticorpi LKM-1), al căror antigen țintă îl reprezintă citocromul p450IID6. De asemenea, specifici pentru tipul al II-lea sunt anticorpii LC1, care sunt identificați în enzima hepatică formiminotransferaza-cicludeaminaza detectabilă în citosol. Serurile de la pacienți cu tipul III de hepatită autoimună prezintă doar anticorpi împotriva antigenilor hepatici solubili (anticorpi SLA). Grupul Internațional de Hepatită („International Hepatitis Group”) a acceptat însă doar provizoriu acest subtip de hepatită autoimună drept tipar clinic independent al afecțiunii.

LKM-1, asociat tipului II de HAI, se manifestă în special la fete în vârstă de 2-14 ani. Determinarea anticorpilor împotriva LKM-1 este de aceea de mare importanță în pediatrie.

Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis. (Istoria naturală, caracteristici clinice și tratamentul hepatitei autoimune)

Semin Liver Dis (1987) 4: 1 - 12

Johnson PJ, McFarlane IA. Raport reuniune: International Autoimmune Hepatitis Group.

Hepatology (1993) 18: 998 - 1005

Manns MP et al.: Anticorpii LKM-1 identifică o scurtă secvență liniară în p450 IID6, o enzimă citocrom P450 monooxigenază.

J Clin Invest (1991) 88: 1370-1378

2 PRINCIPIUL TESTULUI

Anti-LKM-1 este un set de reactivi pentru determinarea cantitativă a anticorpilor IgG anticitocrom p450 IID6 în serul uman sau în plasmă.

Anticorpii LKM-1 în standarde, în controlul pozitiv și în probele diluate ale pacienților reacționează într-o primă etapă cu citocrom recombinant p450 IID6 imobilizat în faza solidă. Componentele nelegate ale serului sunt înlăturate după 60 minute de incubație la temperatura camerei (RT) în urma unei etape de clătire.

Anticorpii imobilizați reacționează în a doua etapă a reacției specifice IgG antiuman conjugat cu peroxidaza de hrean (POD). Excesul de molecule conjugate este separat de complexul imun imobilizat în faza solidă, într-o etapă de clătire, după 30 de minute de incubare la temperatura camerei.

Peroxidaza de hrean schimbă în următoarea etapă a reacției enzimatice soluția incoloră de substrat cu 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) într-un produs final albastru. Această reacție este întreruptă după 15 minute de incubație prin adăugarea unei substanțe acide de stopare, proces în urma căruia are loc o transformare a culorii substanței din albastru în galben.

Densitatea optică (OD) a produsului final măsurată la 450 nm este direct proporțională cu concentrația anticorpilor specifici imobilizați. Cu valorile OD determinate ale standardelor și ale concentrațiilor corespunzătoare la anticorpi, se trasează o curbă standard. Valorile necunoscute ale pacienților sunt citite direct pe această curbă standard.

3 PROBE PACIENȚI

3.1 Producție și stocare

Prelevați sânge prin venepuncție, lăsați-l să se coaguleze și izolați serul printr-o operațiune de centrifugare. La fel se poate proceda cu plasma.

Probele lipemice, hemolizate sau contaminate nu pot fi utilizate.

Depozitarea probelor este posibilă timp de 2 până la 3 zile la o temperatură de 2 °C - 8 °C. Mai mult, probele trebuie congelate la - 20 °C.

Congelările și decongelările repetate trebuie evitate, eventual trebuie stabilite părțile alicote înainte de înghețare.

3.2 Pregătire și utilizare

Înainte de utilizare în anti-LKM-1, probele sunt aduse la temperatura camerei.

Este esențială asigurarea, printr-o scurtă agitare, a unei omogenități corespunzătoare.

Atenție:

Probele pacienților trebuie diluate în test **1 + 100** (v/v) înainte de utilizare, de exemplu, **10 µL probă + 1,0 mL diluant probă (diluât din C)**

4 COMPONENTE TEST

Pentru 96 de determinări.

A [Ag 96]	Placă de microtitrare cu 12 stripuri separabile a câte 8 godeuri căptușite cu citocrom recombinant p450 IID6.	1 sigilată în vid cu săculeț cu agent desicant
B [BUF WASH 10X]	Soluție tampon de spălare, obținută prin diluare de 1:10 pentru 1000 mL soluție	100 mL concentrat capac alb
C [DIL 5X]	Diluant pentru probe, obținut prin diluare de 1:5 pentru 100 mL soluție	20 mL concentrat capac negru
D [CONJ G]	conjugat Conține IgG antiuman (de capră), conjugat cu POD	15 mL gata de folosire capac roșu
E [SOLN TMB]	Substrat 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin în tampon de citrat cu perhidrol	15 mL gata de folosire capac albastru
F [H2SO4 0.25 M]	Soluție de stopare 0,25 M acid sulfuric	15 mL gata de folosire capac galben
0 – 4 [CAL]	Standarde (Ser diluat) Concentr.: 1, 10, 30, 100, 300 U/ml	câte 1 mL gata de folosire
P [CONTROL +]	Control pozitiv (Ser diluat) Concentr.: vezi instrucțiunile din pachet	1 mL Bun pentru utilizare Capac roșu
N [CONTROL –]	Control negativ (Ser diluat) Concentr.: vezi instrucțiunile din pachet	1 mL gata de folosire capac verde

4.1 Alte materiale necesare și adjuvanți

- Micropipete (10 – 100 µL și 100 - 1000 µL) cu vârf
- Pieptene pentru spălare manuală cu 8 canale, cu pompă de vacuum și recipient pentru deșeuri sau aparat de spălare placi de microtitrare
- Fotometru de placă de microtitrare cu filtre optice pentru 450 nm și 620 nm sau 690 nm
- Tuburi, 2 mL
- Apă distilată sau deionizată

4.2 Cantitate și depozitare

Fiecare pachet cu anti-LKM-1 conține reactivi pentru 96 de determinări.

Data de expirare a întregului set de reactivi se află pe eticheta exterioară a trusei cu instrumente de testare. Datele de expirare ale fiecărui reactiv sunt specificate pe reactivii respectivi.

Până la utilizare, toți reactivii anti-LKM-1 se depozitează la o temperatură de 2 °C - 8 °C.

Toate componentele deschise din trusa de testare au valabilitate de cel puțin două luni dacă sunt depozitate corespunzător la o temperatură de 2 °C - 8 °C.

4.3 Pregătire și utilizare

Placa de microtitrare cu stripuri separabile este sigilată în vid într-o pungă de aluminiu ce conține desicant. Deschideți ambalajul abia după ce ajunge la temperatura camerei. Godeurile care nu sunt folosite vor fi protejate de umiditate, așezându-le la loc în pungă împreună cu desicantul și sigilându-le.

Diluati **concentratul de diluare a probelor** 1:5 (1 + 4) cu apă distilată sau deionizată.

Exemplu: 2 mL concentrat + 8 mL apă distilată,
per probă de pacient este necesar 1 mL de soluție tampon diluată (vezi mai sus).

Diluati **concentratul de soluție tampon de spălare** 1:5 (1 + 9) cu apă distilată sau deionizată.

Exemplu: 5 mL concentrat de soluție tampon de spălare + 45 mL apă distilată per strip.

Soluțiile diluate astfel au termen de valabilitate de cca. 30 de zile, la o temperatură de 2 °C - 8 °C.

În timpul operațiunii de spălare, lăsați soluția de spălare să acționeze cel puțin 5 secunde și înlăturați resturile de soluție de spălare printr-o aspirare temeinică sau prin lovirea ușoară a godeurilor.

Evitați expunerea substratului la lumină.

5 EXECUTAREA TESTULUI

- o **Prediluati probele pacienților 1 + 100 (v/v)**
de exemplu, 10 µL ser + 1,0 mL diluant pentru probe (din C)
 - o **Respectați succesiunea prevăzută a operațiilor de pipetare și timpii de execuție.**
1. Aduceți reactivii de test și godeurile necesare testării la temperaturacamerei (RT) (18 °C - 25 °C) și agitați înainte de folosire toți reactivii.
 2. Pipetați
100 µL standarde (0 - 4),
100 µL controale (P) și (N),
100 µL de la **1 + 100** seruri de pacient
în godeurile prevăzute.
 3. Incubați **60 minute** la temperatura camerei (18 °C - 25 °C).
 4. Decantați și spălați **de 3 ori** cu **300 µL** soluție de spălare (diluati din B)
 5. Pipetați **100 µL** conjugat (D) în fiecare godeu.
 6. Incubați **30 minute** la temperatura camerei (18 °C - 25 °C).
 7. Decantați și spălați **de 3 ori** cu **300 µL** soluție de spălare (diluati din B).
 8. Pipetați **100 µL** substrat (E) în fiecare godeu.
 9. Incubați **15 minute** la temperatura (18 °C - 25 °C) **în întuneric**.
 10. Pipetați în fiecare godeu **100 µL** soluție de stopare (F) și agitați puțin.
 11. Măsurați OD la **450 nm** la 620 (690) nm cu un fotometru de placă de microtitrare timp de cel mult 30 de minute.

6 CALCULUL REZULTATULUI

Valorile medii OD (MW) ale standardelor 0-4 sunt asignate pe ordonată în corespondență cu concentrațiile de anticorpi LKM-1 (U/ml) (abscisa, scala logaritmică).

De aici rezultă o curbă standard, pe care se pot citi direct valorile medii ale densităților optice la concentrațiile anticorpilor anti-LKM-1 ale probelor diluate necunoscute ale pacienților.

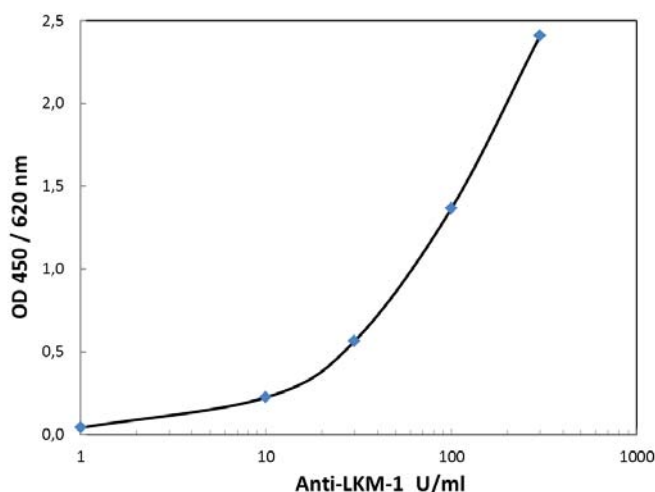
Atât timp cât este aplicată soluția de diluare a probelor de 1 + 100, nu este nevoie de niciun factor de multiplicare pentru determinarea concentrației anticorpilor LKM-1, deoarece standardele există deja în această soluție de diluare.

Această evaluare se execută de asemenea automat prin unitatea de analiză a fotometrului de placă de microtitrare

6.1 Exemplu de calcul

Probă	OD (a)	OD (b)	OD (MW)	U/mL
Standard 0	0,037	0,044	0,041	1
Standard 1	0,221	0,226	0,224	10
Standard 2	0,568	0,560	0,564	30
Standard 3	1,406	1,328	1,367	100
Standard 4	2,296	2,186	2,241	300
Pacient 1	0,960	0,967	0,964	60

CURBĂ STANDARD TIPICĂ



Acest exemplu nu poate fi utilizat pentru calcularea valorilor pentru pacienți.

La probe ale căror valori OD depășesc valorile OD ale calibratorului, se repetă determinarea cu o prediluare mai ridicată a probelor (în diluantul pentru probe). Factorul corespunzător de diluare trebuie avut în considerare la calculul rezultatelor.

6.2 Validarea testului

Testul poate fi evaluat dacă:

- o Valoarea medie OD a standardului 4 $\geq 1,2$
- o Valoarea determinată pentru controlul P se situează în cadrul domeniului specificat (a se vedea prospectul)
- o Controlul N este negativ

Dacă nu sunt îndeplinite aceste criterii de valabilitate, testul trebuie repetat. Asigurați-vă că procesarea se face strict conform instrucțiunilor de utilizare (preparare corectă a reactivilor, timpi și temperaturi corecte de intubație, spălare atentă). În cazul în care criteriile de valabilitate nu vor fi îndeplinite nici după repetarea testului, vă rugăm să contactați producătorul.

7 VALORI DE REFERINȚĂ

Anticorpi LKM-1	U/mL
pozitiv	> 15
Domeniu normal	≤ 15

Ca urmare a diferențelor din rândul populației, se recomandă ca fiecare laborator să își adapteze domeniile patologice și normale de referință proprii pentru nivelul de autoanticorpi pentru Anti-LKM-1. Valorile sus-menționate trebuie, prin urmare, să fie considerate doar o recomandare.

7.1 Limite ale metodei

În urma evaluării indivizilor sănătoși cu trusa de instrumente Anti-LKM-1 rezultatul trebuie să fie negativ. Totuși, subiecții pot prezenta anticorpi pozitivi împotriva citocromului p450 IID6.

Un diagnostic clinic nu trebuie să fie pus doar cu ajutorul rezultatelor metodei individuale de diagnosticare. Pentru emiterea diagnosticului, medicul trebuie să ia în considerare toate rezultatele clinice și de laborator posibile.

8 CARACTERISTICILE TESTULUI

8.1 Calibrarea

În lipsa unui standard internațional de referință, rezultatele sunt indicate în unități arbitrare U/mL.

8.2 Paralelism

Pentru serurile selectate s-a putut determina un raport liniar între diluare și concentrație adecvată de anticorpi. Pe baza eterogenității anticorpilor umani, nu trebuie să se excludă totuși posibilitatea ca serurile individuale să prezinte un comportament neliniar.

8.3 Sensibilitate analitică

Sensibilitatea analitică a Anti-LKM-1 a fost determinată cu 1,0 U/mL.

8.4 Specificitate

Nu s-au găsit reactivități încrucișate cu alți auto-antigeni.

8.5 Precizie

Variația intra-testare

Probă	MW U/mL	Abatere standard	CV (%)
1	182,5	6,4	3,5
2	61,8	2,1	3,5
3	19,6	0,6	3,1
4	5,1	0,4	8,1

Variația intra-testare

Probă	MW U/mL	Abatere standard	CV (%)
1	190,1	6,7	3,5
2	63,8	1,4	2,3
3	19,7	0,2	1,2
4	5,4	0,1	2,2

9 INDICAȚII GENERALE ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

- o Acest kit de reactivi este destinat utilizării in-vitro și trebuie realizat numai de personal de laborator instruit. Instrucțiunile de lucru trebuie să fie strict respectate.
- o Trusa de instrumente pentru test sau reactivii săi deschiși trebuie să se utilizeze numai în cadrul termenelor de valabilitate specificate.
- o Amestecarea componentelor unor truse de instrumente de testare care aparțin diferitelor loturi nu este permisă.
- o Acest lucru se aplică și pentru utilizarea reactivilor altor producători pentru completarea unei truse de instrumente de testare deja deschisă.
- o Temperatura recomandată de depozitare a reactivilor deschiși până la refolosirea acestora este de 2 °C - 8 °C.
- o Câțiva reactivi conțin cantități reduse de neolon M10 ($\leq 0,05\%$) ca și agent de conservare. Nu înghițiți reactivii și evitați contactul cu mucoasele.
- o Toți reactivii acestei truse de instrumente de testare, care sunt de origine umană, au dat în cazul testării la HBsAg (Hepatitis B surface Antigen - antigen de suprafață al virusului hepatitei B) respectiv AK împotriva HIV (Human Immunodeficiency Virus - Virusul Imunodeficienței Umane) un rezultat negativ. Totuși, prin niciun test nu poate fi exclusă cu siguranță absolută existența agenților infecțioși. Reactivii trebuie să fie tratați prin urmare ca material potențial infecțios.
- o În cazul manipulării componentelor trusei de instrumente de testare, precum și a probelor de la pacienți, și în cazul controalelor trebuie respectate prevederile privind prevenirea accidentelor la manipularea materialului potențial infecțios și a substanțelor chimice periculoase. Îndeosebi trebuie să se respecte următoarele reguli:
 - Nu consumați alimente, băuturi și nu fumați!
 - Nu pipetați cu gura!
 - Purtați mănuși pentru evitarea contactului cu reactivii și serurile!
 - Respectați indicațiile de siguranță privind componentele individuale de testare!
- o Recomandăm să realizați controale de calitate proprii prin intermediul serurilor de control interne de laborator (a se vedea și Regulile de calibrare, Jurnalul Oficial Federal I, pag. 1657, 1988 precum și liniile directoare ale Camerei Federale a Medicilor pentru Asigurarea Calității Testelor Medicale Cantitative de Laborator, Jurnalul Oficial German al Medicilor, caietul 42, pag. A2747-59, 2001).

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português	Română
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia	Marcaj de conformitate CE
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de utilização	Respectați instrucțiunile de utilizare *
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in-vitro</i>
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo	Cod articol *
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote	Cod de lot *
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações	Suficient pentru <n> teste
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation	Limites de temperatura	Limită de temperatură *
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade	A se utiliza până la data de *
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante	Producător
	Caution *	Achtung				Atenção	Atenție
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	Apenas para fins de investigação	Doar în scopuri de cercetare
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume/Quantidade	Volume/Quantità