

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

**LKM-1**

REF DE7703

IVD



Lagerung / Storage : 2–8 °C

# Gebrauchsanweisung

## Inhaltsverzeichnis

---

1. Zweckbestimmung.....	1
2. Klinische Anwendung und Testprinzip.....	1
3. Kit Bestandteile.....	2
4. Lagerung und Haltbarkeit.....	2
5. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	3
6. Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung.....	3
7. Testdurchführung.....	4
8. Quantitative und qualitative Auswertung .....	5
9. Technische Daten.....	5
10. Testdaten/ Testcharakteristik.....	6-7
11. Literatur.....	7
A : Pipettierschema .....	8
B : Test procedure.....	9

## 1. Zweckbestimmung

---

Der Demeditec **LKM-1** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay mit rekombinantem humanen Cytochrom p450 IID6 zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Leber- und Nieren-Mikrosomen (*liver-kidney microsomes*) in humanem Serum.

Der Test dient der Diagnosestellung der autoimmunen Hepatitis (AIH).

## 2. Klinische Anwendung und Testprinzip

---

Die Autoimmune Hepatitis (AIH) ist eine chronisch progressive Lebererkrankung unbekannter Ursache, die gut auf immunsuppressive Therapie anspricht, unbehandelt jedoch eine schlechte Prognose hat. Eine frühe und sichere Diagnosestellung ist daher von großer Wichtigkeit. Charakteristische Eigenschaften der AIH sind das histologische Bild einer periportalen Hepatitis in Abwesenheit viraler Marker, eine Hypergammaglobulinämie und, bei der Mehrzahl der Patienten, die Anwesenheit von Autoantikörpern im Serum. Anti-nukleäre Antikörper (ANA), Antikörper gegen glatte Muskulatur (SMA, *smooth-muscle antibodies*), Antikörper gegen Leber- und Nieren Mikrosomen (LKM, *liver kidney microsomes*) und Antikörper gegen lösliches Leber-Antigen (SLA, *soluble liver antigen*) sind Marker-Antikörper für die AIH. 52% der AIH-Patienten sind ANA und/oder SMA positiv, 20% SLA positiv und 3% haben LKM-1 Antikörper. Alle diese Antikörper sind für die Diagnose einer AIH von hohem Wert, als einzige Autoantikörper sind bisher jedoch nur SLA-Autoantikörper für die AIH hochspezifisch. ANA/SMA treten auch bei 10-15% der Patienten mit viraler Hepatitis oder anderen immunvermittelten Erkrankungen auf. LKM-1 findet man auch bei Patienten mit Hepatitis C.

LKM-Antikörper können hinsichtlich ihrer Zielantigene in drei Typen unterschieden werden. LKM-1 Antikörper sind gegen Cytochrom p450 IID6 gerichtet, einem cytoplasmatischen 50 kDa Protein, das in Hepatozyten und proximalen Nieren-Tubuli zu finden ist. LKM-2 Antikörper sind mit der Ticrynafen-induzierten Hepatitis assoziiert. Zielantigen von LKM-2 ist das Cytochrom p450 IIC9, ein Cytochrom p450 Isoenzym, das die metabolische Oxidation des Medikamentes induziert. LKM-3 Antikörper sind mit chronischer Hepatitis D assoziiert, das Zielantigen ist hier die UDP-Glucuronosyl-Transferase.

Die LKM-1 assoziierte AIH tritt bevorzugt im Kindesalter auf und hier vorwiegend bei Mädchen im Alter zwischen 2 und 14 Jahren. Die Bestimmung von LKM-1 ist daher in der Pädiatrie von großer Bedeutung.

### **Testprinzip**

Die 1:101 verdünnten Serumproben werden in den Kavitäten, welche mit dem spezifischen Antigen beschichtet sind, inkubiert. Hierbei binden spezifische Antikörper aus dem Patientenserum, wenn vorhanden, an das Antigen auf der Platte; ungebundene Serumkomponenten werden im folgenden Waschschrift gewegewaschen. Anschließend werden anti-Human Immunoglobuline, die mit Meerrettich-Peroxidase markiert sind (Konjugat), zugegeben. Während einer Inkubation binden diese an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex, nicht gebundene Immunglobuline werden im folgenden Waschschrift entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt mit einer enzymatischen Farbreaktion (blau) des Substrates, die mit verdünnter Säure abgestoppt wird (Farbumschlag nach gelb). Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der an den Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Konjugatmenge und somit direkt proportional zur Antikörperkonzentration im Serum.

### 3. KIT Bestandteile

---

#### Vor Gebrauch verdünnen:

- Probenpuffer 5x 1 Flasche, 20 ml - 5 fach konzentriert (weißer Verschluss: gelb eingefärbt)  
Bestandteile: Tris NaCl, BSA, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)
- Waschpuffer 50x 1 Flasche, 20 ml - 50 fach konzentriert (weißer Verschluss: grün eingefärbt)  
Bestandteile: Tris, NaCl, Tween 20, Natriumazid < 0,1% (Konservierungsstoff)

#### Gebrauchsfertig:

- Negativ Kontrolle 1 Flasche, 1,5 ml (grüner Verschluss: gelb eingefärbt)  
Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid <0,1% (Konservierungsstoff)
- Positiv Kontrolle 1 Flasche, 1,5 ml (roter Verschluss: gelb eingefärbt)  
Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid <0,1% (Konservierungsstoff)
- Cut-off Kalibrator 1 Flasche, 1,5 ml (blauer Verschluss: gelb eingefärbt)  
Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid <0,1% (Konservierungsstoff)
- Kalibratoren 6 Flaschen, je 1,5 ml mit 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml  
(Farbintensität mit Konzentration steigend: gelb eingefärbt)  
Bestandteile: Humanes Serum (verdünnt), Natriumazid <0,1% (Konservierungsstoff)
- Konjugat 1 Flasche, 15 ml IgG (blauer Verschluss: blau eingefärbt)  
Bestandteil: Anti-human Immunoglobulin markiert mit Meerrettichperoxidase
- TMB Substrat 1 Flasche, 15 ml (schwarzer Verschluss)  
Bestandteil: Stabilisiertes TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Stopp-Lösung 1 Flasche, 15 ml (weißer Verschluss: farblose Lösung)  
Bestandteil: 1M Salzsäure
- Mikrowell-Streifen 12 x 8 Kavitäten, brechbar.  
Beschichtung siehe Punkt 1

#### Erforderliche Materialien:

Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 620nm (600-690 nm). Glaswaren (Zylinder 100-1000ml), Röhrchen für Verdünnungen, Vortexer, Mikropipetten (10, 100, 200, 500, 1000 µl) oder einstellbare Multipipette. Wascheinheit für Mikrotiterplatten (300µl Multipipette oder Mehrkanalpipette oder automatisches Waschsysteem), Filterpapier. Unsere Tests wurden für die Verwendung mit gereinigtem Wasser (purified water) nach der Definition der U.S. Pharmakopöe (USP 26 - NF 21) und der Europäischen Pharmakopöe entwickelt (Eur. Ph. 4te Ed.).

### 4. Lagerung und Haltbarkeit

---

Die Lagerung der Kitreagenzien und der Mikrotiterplatte soll bei 2-8°C/35-46°F in den Originalflaschen erfolgen. Verdünnte Lösungen sind bei 4°C/39°F einen Monat haltbar. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten.

**Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen! Eine starke Lichteinwirkung auf die Substratlösung TMB ist zu vermeiden. Mikrotiterplatten stets in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel verschlossen aufbewahren.**

## 5. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

---

### 5.1 Gesundheitsrisiko

***DIESES PRODUKT DARF AUSSCHLIESSLICH ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK VERWENDET WERDEN.***

Die Anwendung muss durch Personal erfolgen, das speziell in der Verwendung von in vitro-Diagnostika unterrichtet und ausgebildet wurde. Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien sind bei vorschriftmäßigem Gebrauch weder als toxisch noch als gesundheitsgefährlich einzustufen, dennoch sollte zur Gewährleistung der maximalen Sicherheit des Anwenders folgendes eingehalten werden:

#### ***Empfehlungen und Vorsichtsmaßnahmen***

Da einzelne Komponenten des Kits potentiell gefährdende Reagenzien enthalten, können diese eine Reizung der Augen und der Haut hervorrufen.

**ACHTUNG:** Kalibratoren, Kontrollen und Puffer enthalten Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) als Konservierungsstoff.  $\text{NaN}_3$  kann toxisch wirken, sofern es eingenommen oder über die Haut oder Augen adsorbiert wird.  $\text{NaN}_3$  kann mit Blei oder Kupferrohren hochexplosive Metallazide bilden. Zur Vermeidung von Azidanreicherungen sollte bei der Entsorgung dieser Lösungen bitte mit einer großen Menge Wasser nachgespült werden. Bitte die Vorgaben örtlicher/ nationaler Vorschriften zur Dekontamination beachten.

Während des Arbeitens mit dem Kit nicht essen, trinken oder rauchen.

Nicht mit dem Mund pipettieren, Einmal-Handschuhe tragen.

Die in diesem Produkt enthaltenen Reagenzien humanen Ursprungs (Kontrollen und Kalibratoren) erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HbsAg), Hepatitis C und HIV 1 und 2 als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierte Krankheitserreger enthalten sind. Daher sind Kontrollen, Kalibratoren sowie Patientenseren als potentiell infektiös einzustufen und entsprechend der nationalen Rechtslage zu handhaben.

### 5.2 Allgemeine Hinweise

Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden, da dies zu Verfälschungen der Messergebnisse führen kann.

Alle Kit-Komponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20-32°C/68-89,6°F) bringen und gut durchmischen. Das vorgeschriebene Protokoll zur Durchführung des Tests ist unbedingt einzuhalten.

**Inkubation:Für eine Testabarbeitung mit Automaten empfehlen wir eine Temperatur von 30°C /86°F.**

Setzen Sie die einzelnen Kit-Komponenten niemals höheren Temperaturen als 37 °C/ 98,6°F aus.

Die Substrat-Lösung immer mit verkaufsneuen Pipettenspitzen pipettieren, um Kontaminationen zu vermeiden. Intensiven Lichtkontakt der Substratlösung vermeiden. Konjugat-Lösung niemals mit Pipettenspitzen pipettieren, welche mit anderen Reagenzien kontaminiert sind.

**Eine endgültige klinische Diagnose sollte nicht alleine auf den Ergebnissen des durchgeführten Tests erfolgen, sondern vom Arzt unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde erstellt werden. Die Diagnose sollte unbedingt mit verschiedenen diagnostischen Methoden bestätigt werden.**

## 6. Probenentnahme, Vorbereitung und Lagerung

---

Die Verwendung frischer Serumproben wird empfohlen. Die Blutentnahme hat nach der nationalen Rechtslage zu erfolgen. Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Serumproben nicht verwenden.

Bei trüben Proben die Partikel niedrig abzentrifugieren (<1000 x g).

Blutproben in saubere, trockene und leere Röhrchen aufnehmen. Nach der Gewinnung sollte das Serum direkt verwendet werden. Serumproben können bei 2-8°C/35-46°F zwei bis drei Tage aufbewahrt werden, ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben bei -20°C tiefgefroren werden.

## 7. Testdurchführung

---

### 7.1 Vorbereitung

#### **Verdünnung konzentrierter Reagenzien:**

Konzentrierten Probenpuffer 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 20 ml plus 80 ml).

Konzentrierten Waschpuffer 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnen (z.B. 20 ml plus 980 ml).

#### **Verdünnung der Patientenproben:**

Serumproben 1:101 mit verdünntem Probenpuffer (1x) verdünnen und mischen,

z.B. 1000 µl Probenpuffer + 10 µl Serum.

#### **Waschen:**

Es werden 20 ml verdünnten Waschpuffers (1x) pro 8 Kavitäten oder 200 ml pro 96 Kavitäten benötigt z.B. 4 ml Konzentrat plus 196 ml destilliertes Wasser.

#### **Automatisiertes Waschen:**

Für die Inbetriebnahme des Instrumentes und das Totvolumen sind zusätzliche Waschpuffermengen zu berücksichtigen.

#### **Manuelles Waschen:**

Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte auf Filterpapier entfernen. 300 µl verdünnten Waschpuffer in jede Kavität pipettieren, 20 Sekunden warten. Den Vorgang noch zweimal wiederholen.

#### **Mikrotiterplatte:**

Unbenutzte Kavitäten entfernen und fest verschlossen in der Verpackungsfolie mit Trockenbeutel kühl lagern (2-8°C/35-46°F).

### 7.2 Arbeitsschritte

**Beachten sie das Pipettierschema in Annex A und den Testablauf in Annex B**

**Wir empfehlen die Doppelbestimmung von Proben und Kontrollen.**

**Der Cut-off Kalibrator soll nur für die qualitative Beurteilung verwendet werden.**

- Je 100 µl der verdünnten Seren in die vorgesehenen Kavitäten pipettieren.
- Je 100 µl der Kalibratoren ODER des Cut-off Kalibrators sowie der Negativ- und Positiv- Kontrolle in die Kavitäten pipettieren.
- 30 Minuten bei 20-32°C/68-89,6°F inkubieren.
- 3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.
- 100 µl Enzymkonjugatlösung in jede Kavität geben.
- 30 Minuten bei 20-32°C/68-89,6°F inkubieren.
- 3 mal mit jeweils 300 µl 1:50 verdünntem Waschpuffer waschen.
- 100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
- 30 Minuten bei 20-32°C/68-89,6°F inkubieren, vor intensiver Lichteinstrahlung schützen.
- 100 µl Stopplösung pro Kavität in der Reihenfolge der Substratzugabe pipettieren.
- Mindestens 5 Minuten inkubieren.
- Platte vorsichtig 5 Sekunden schütteln.
- Optische Dichte bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten messen (empfehlenswert bei 450/620 nm).

## 8. Quantitative und qualitative Auswertung

Die **quantitative Auswertung** erfolgt anhand einer Standardkurve, bei der die **optische Dichte der Kalibratoren (y-Achse)** gegen die Konzentration in **U/ml (x-Achse)** aufgetragen wird. Eine log/lin Auftragung und ein 4-Parameter-Fit wird zur Auswertung empfohlen. Anhand der Kurve wird aus der optischen Dichte der Probe die Antikörper-Konzentration in **U/ml** ermittelt.

Normalbereich	Grenzwertig	Positive Ergebnisse
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

### Auswertungsbeispiel

Die Erstellung einer Standardkurve wird für jeden Testansatz empfohlen.

Kalibratoren IgG	OD 450/620 nm	CV % (Varianz)
0 U/ml	0,046	2,4
3 U/ml	0,171	2,6
10 U/ml	0,372	1,0
30 U/ml	0,698	3,8
100 U/ml	1,456	0,4
300 U/ml	2,396	2,0

### Kalkulationsbeispiel

Patient	Replikat (OD)	Mittelwert (OD)	Ergebnis (U/ml)
P 01	0,533/0,569	0,551	19,8
P 02	1,156/1,196	1,176	68,7

Chargen spezifische Daten entnehmen Sie bitte dem beiliegenden Kontrollzertifikat. Medizinische Laboratorien sollten In-house Qualitätskontrollen mit eigenen Kontrollen und/oder Poolseren nach EU Reglement durchführen.

**Dieses Beispiel darf nicht zur Interpretation der Patientenresultate benutzt werden !**

Es wird empfohlen, daß sich jedes Labor seine eigenen Normalwerte, basierend auf eigener Technik, Kontrollen, Ausrüstung und Patientenpopulation erarbeitet.

Die qualitative Auswertung erfolgt anhand des Vergleichs der optischen Dichte der Patientenprobe mit der optischen Dichte des Cut-off Kalibrators. Liegt die optische Dichte der Patientenprobe im Bereich von +/-20% des Cut-off Kalibrators, so ist diese als grenzwertig zu bewerten. Bei einer höheren OD ist die Patientenprobe als positiv, bei einer niedrigeren OD als negativ einzustufen.

**Negativ:**  $OD_{\text{patient}} < 0,8 \times OD_{\text{cut-off}}$

**Grenzwertig:**  $0,8 \times OD_{\text{cut-off}} \leq OD_{\text{patient}} \leq 1,2 \times OD_{\text{cut-off}}$

**Positiv:**  $OD_{\text{patient}} > 1,2 \times OD_{\text{cut-off}}$

## 9. Technische Daten

<b>Probenmaterial:</b>	Serum
<b>Probenvolumen:</b>	10 µl Serum für 1:101 Verdünnung mit 1x Probenpuffer
<b>Gesamt-Inkubationszeit:</b>	90 Minuten bei 20-32°C/68-89,6°F
<b>Messbereich:</b>	0-300 U/ml
<b>Analytische Sensitivität:</b>	1,0 U/ml
<b>Lagerung:</b>	Bei 2-8 °C in Originalflaschen
<b>Zahl der Bestimmungen:</b>	96 Tests

## 10. Testdaten/Testcharakteristik

### 10.1 Analytische Sensitivität

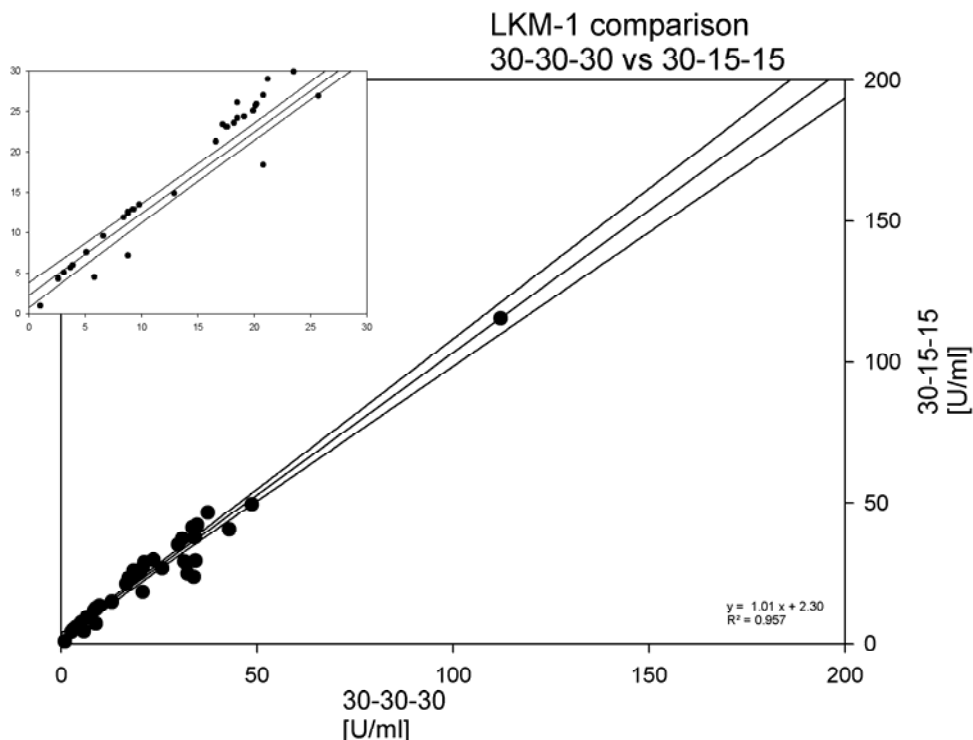
Die analytische Sensitivität des *Demeditec LKM-1 (REF7703)* von 1,0 U/ml wurde durch 30 maliges Testen von Probenpuffer ermittelt.

### 10.2 Spezifität und Sensitivität

Die Mikrotiterplatte ist mit **rekombinantem humanem Cytochrom p450 IID6** beschichtet. Kreuzreaktivitäten mit anderen Antigenen konnten nicht nachgewiesen werden. Anti-LKM-1 Antikörper besitzen eine diagnostische Spezifität von >99% für Autoimmun Hepatitis Typ 2. Die diagnostische Sensitivität von Anti-LKM-1 Antikörpern für Autoimmun Hepatitis Typ 2 liegt bei 84%. Die Daten wurden mit dem *Demeditec LKM-1 (REF7703)* Testkit ermittelt.

### Korrelation:

Die Vergleichbarkeit dieser Daten wurde mit 54 Seren auf dem Demeditec DE 7703 und dem Demeditec DE3703 bestimmt. Eine lineare Regressionsanalyse der beiden Teste zeigt, dass beide Teste äquivalent messen. Diese Daten beinhalten die Messung von 39 Seren nahe des Cut-offs.





### 10.3 Linearität

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

Proben Nr.	Verdünnung	gemessene Konzentration (U/ml)	erwartete Konzentration (U/ml)	Wiederfindung (%)
1	1 / 100	78,9	80,0	98,6
	1 / 200	39,8	40,0	99,5
	1 / 400	18,9	20,0	94,5
	1 / 800	9,6	10,0	96,0
2	1 / 100	34,2	33,0	103,6
	1 / 200	17,2	16,5	104,2
	1 / 400	8,1	8,3	97,6
	1 / 800	4,0	4,2	95,2

### 10.4 Präzision

Zur Kontrolle der Assaypräzision wurde mit drei Seren in verschiedenen Bereichen der Standardkurve die Intra- und Interassay-Varianz ermittelt.

Intra-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert (U/ml)	CV (%)
1	210,0	1,6
2	77,5	2,8
3	18,4	3,6

Inter-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert (U/ml)	CV (%)
1	207,0	4,2
2	73,8	2,3
3	17,6	1,5

### 10.5 Kalibration

Das quantitative Meßsystem ist mangels eines internationalen Referenzstandards in vorläufigen Einheiten kalibriert. Die Ergebnisse werden in U/ml angegeben.

## 11. Literatur

- Krawitt EL (1996).**  
*Autoimmune Hepatitis.*  
N Engl J Med 334: 897-903.
- Meyer zum Büschenfelde KH, Lohse AW (1995).**  
*Autoimmune Hepatitis.*  
N Engl J Med 333: 1004-1005.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi et al. (1999).**  
*International Autoimmune Hepatitis Group Report: a review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis.*  
J Hepatol 31: 929-938.
- Manns MP et al. (1991).**  
*LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450 IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase.*  
J Clin Invest 88: 1370-1378.
- Homberg JC, Andre C, Abuaf A (1984).**  
*A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM-2) in tienilic acid-induced hepatitis.*  
Clin Exp Immunol 55: 561-570. :
- Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, Johnson EF, Tukey RH, Manns MP (1994).**  
*Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D.*  
Lancet 344:578-81

## ANHANG A: Pipettierschema

Wir empfehlen, die Kalibratoren, Kontrollen und Proben wie folgt zu pipettieren:

Zur **quantitativen Auswertung** verwenden Sie die Kalibratoren zur Erstellung einer Standardkurve.

Zur **qualitativen Auswertung** verwenden Sie den Cut-off Kalibrator.

	for <b>quantitative interpretation</b> use calibrators to establish a standard curve						for <b>qualitative interpretation</b> use cut-off calibrator					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CalA	CalE	P1				NC	P2				
B	CalA	CalE	P1				NC	P2				
C	CalB	CalF	P2				CC	P3				
D	CalB	CalF	P2				CC	P3				
E	CalC	PC	P3				PC	...				
F	CalC	PC	P3				PC	...				
G	CalD	NC	...				P1	...				
H	CalD	NC	...				P1	...				

CalA: calibrator A, CalB: calibrator B, CalC: calibrator C, CalD: calibrator D, CalE: calibrator E, CalF: calibrator F

PC: positive control

NC: negative control

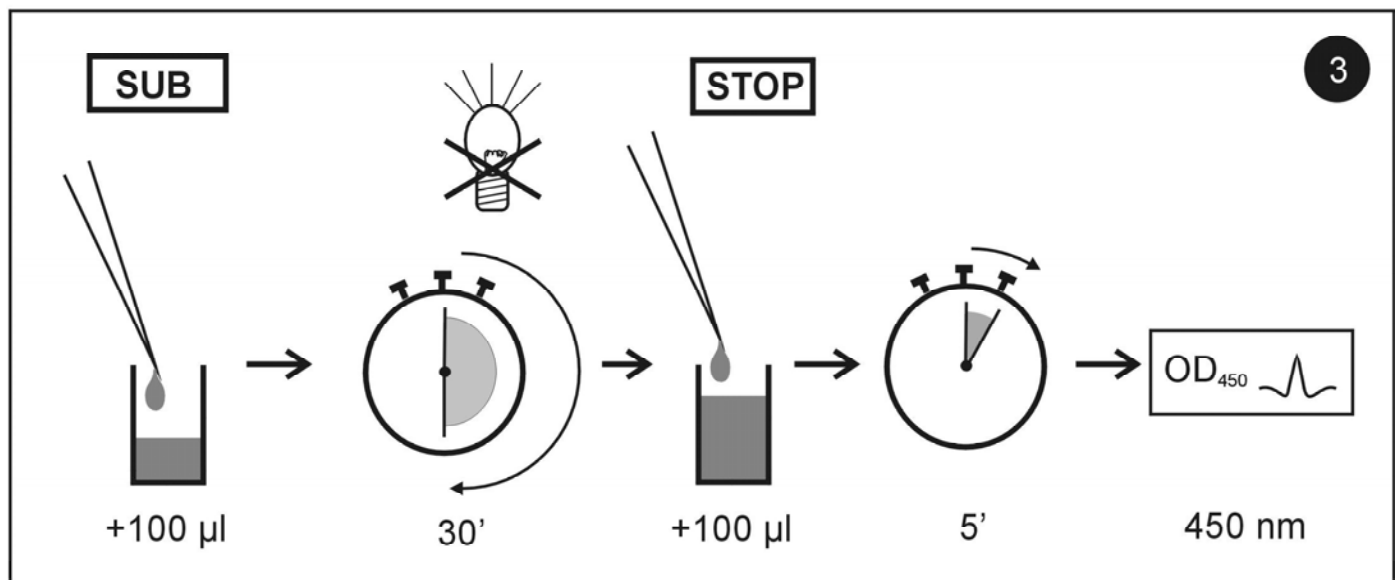
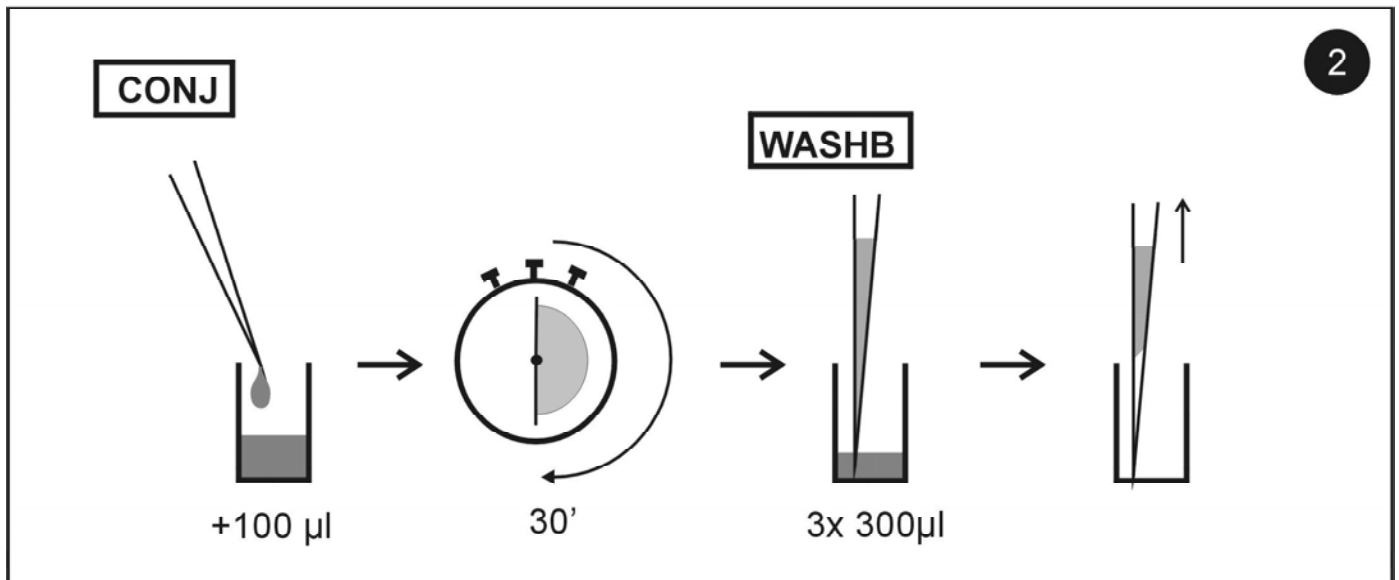
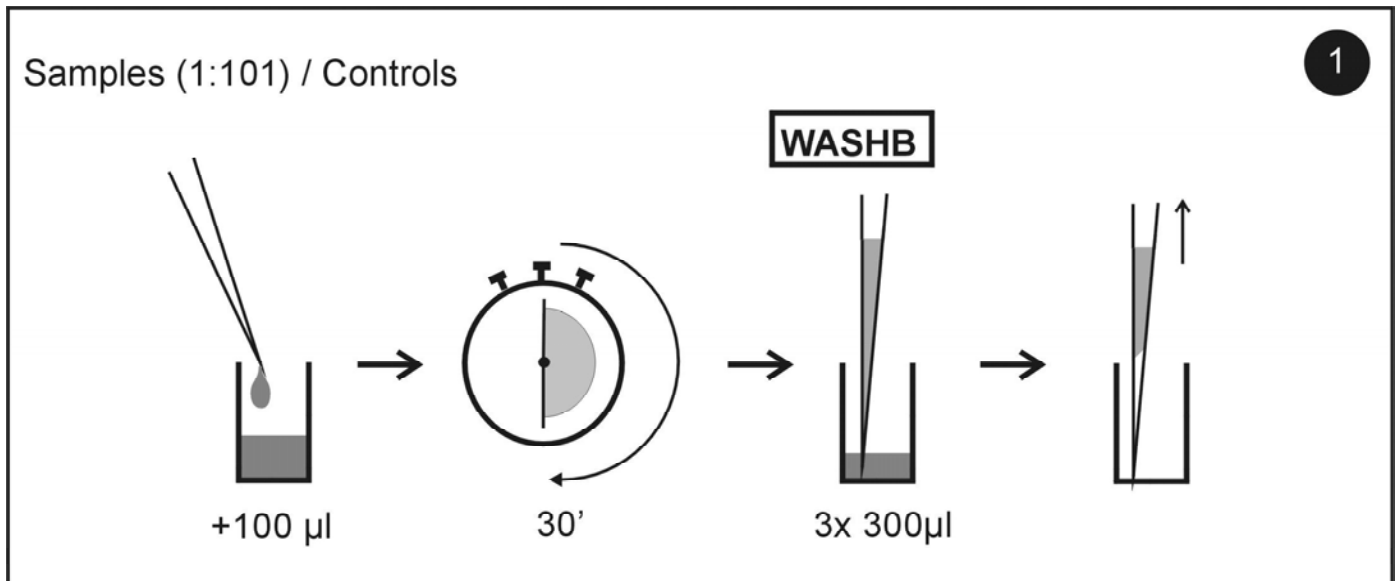
CC: Cut-off calibrator

P1: patient 1

P2: patient 2

P3: patient 3

## Annex B: Testablauf



# Instruction manual

## Contents

---

1. Intended Use.....	1
2. Clinical Applications and Principle of the Assay.....	1
3. Kit Contents.....	2
4. Storage and Shelf Life.....	2
5. Precautions of Use.....	3
6. Sample Collection, Handling and Storage.....	3
7. Assay Procedure.....	4
8. Quantitative and Qualitative Interpretation.....	5
9. Technical Data.....	6
10. Performance Data.....	6-7
11. Literature.....	7
A : Pipetting scheme.....	8
B : Test Procedure.....	9

## 1. Intended Use

---

**Demeditec LKM-1** is a solid phase enzyme immunoassay employing human recombinant cytochrome p450 IID6 for the quantitative and qualitative detection of antibodies against liver-kidney microsomes (LKM) in human serum.

The assay is a tool for the diagnosis of autoimmune hepatitis (AIH).

## 2. Clinical Application and Principle of the Assay

---

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic progressive liver disease of unknown origin that responds well to immunosuppressive therapy, but has a poor prognosis if untreated. Early and accurate diagnosis is therefore of great importance. AIH is characterized by histological features of periportal hepatitis in the absence of viral markers, by hypergammaglobulinemia and, in the majority of patients, by the presence of autoantibodies in serum. Anti-nuclear antibodies (ANA), smooth muscle antibodies (SMA), anti-liver kidney microsomal antibodies (LKM) and antibodies against soluble liver antigen (SLA) are marker autoantibodies for AIH. 52% of AIH patients are positive for ANA and/or SMA, 20% for SLA and 3% for LKM-1. These antibodies are of diagnostic value for AIH but the only autoantibodies highly specific for AIH are SLA. ANA/SMA also occur in 10-15% of patients with viral hepatitis and other immune-mediated diseases. LKM-1 are also associated with hepatitis C.

Three types of LKM antibodies can be distinguished according to the target antigens. LKM-1 antibodies are directed against cytochrome p450 IID6, a 50 kDa cytoplasmic protein found in hepatocytes and renal proximal tubular cells. LKM-2 antibodies are associated with ticrynafen (tienilic acid) -induced hepatitis. The target antigen is cytochrome p450 IIC9, a cytochrome p450 isoenzyme that catalyzes the metabolic oxidation of the drug. LKM-3 antibodies are associated with chronic hepatitis D. The target antigen is UDP-1 glucuronosyl transferase.

LKM-1 associated AIH predominantly occurs in girls between 2 and 14 years of age, thus determination of LKM-1 is very important in pediatrics.

### ***Principle of the test***

Serum samples diluted 1:101 are incubated in the microplates coated with the specific antigen. Patient's antibodies, if present in the specimen, bind to the antigen. The unbound fraction is washed off in the following step. Afterwards anti-human immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase (conjugate) are incubated and react with the antigen-antibody complex of the samples in the microplates. Unbound conjugate is washed off in the following step. Addition of TMB-substrate generates an enzymatic colorimetric (blue) reaction, which is stopped by diluted acid (color changes to yellow). The rate of color formation from the chromogen is a function of the amount of conjugate bound to the antigen-antibody complex and this is proportional to the initial concentration of the respective antibodies in the patient sample.

### 3. Kit Contents

---

#### **To be reconstituted:**

5x Sample Buffer 1 vial, 20 ml - 5x concentrated (capped white: yellow solution)

Containing: Tris, NaCl, BSA, sodium azide < 0.1% (preservative)

50x Wash Buffer 1 vial, 20 ml - 50x concentrated (capped white: green solution)

Containing: Tris, NaCl, Tween 20, sodium azide < 0.1% (preservative)

#### **Ready to use:**

Negative Control 1 vial, 1.5 ml (capped green: yellow solution)

Containing: Human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative)

Positive Control 1 vial, 1.5 ml (capped red: yellow solution)

Containing: Human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative)

Cut-off Calibrator 1 vial, 1.5 ml (capped blue: yellow solution)

Containing: Human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative)

Calibrators 6 vials, 1.5 ml each 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/ml

(color increasing with concentration: yellow solutions)

Containing: Human serum (diluted), sodium azide < 0.1% (preservative)

Conjugate 1 vial, 15 ml IgG (capped blue: blue solution)

Containing: Anti-human immunoglobulins conjugated to horseradish peroxidase

TMB Substrate 1 vial, 15 ml (capped black)

Containing: Stabilized TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Stop Solution 1 vial, 15 ml (capped white: colorless solution)

Containing: 1M Hydrochloric Acid

Microtiterplate 12x8 well strips with breakaway microwells

Coating see paragraph 1

#### **Material required but not provided:**

Microtiter plate reader 450 nm reading filter and optional 620 nm reference filter (600-690 nm). Glass ware(cylinder 100-1000ml), test tubes for dilutions. Vortex mixer, precision pipettes (10, 100, 200, 500, 1000 µl) or adjustable multipipette (100-1000ml). Microplate washing device (300 µl repeating or multi-channel pipette or automated system), adsorbent paper.

Our tests are designed to be used with purified water according to the definition of the United States Pharmacopeia (USP 26 - NF 21) and the European Pharmacopeia (Eur.Ph. 4th ed.).

### 4. Storage and Shelf Life

---

Store all reagents and the microplate at 2-8°C/35-46°F, in their original containers. Once prepared, reconstituted solutions are stable for 1 month at 4°C/39°F, at least. **Reagents and the microplate shall be used within the expiry date indicated on each component, only. Avoid intense exposure of TMB solution to light. Store microplates in designated foil, including the desiccant, and seal tightly.**

## 5. Precautions of Use

---

### 5.1 Health hazard data

***THIS PRODUCT IS FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.*** Thus, only staff trained and specially advised in methods of in vitro diagnostics may perform the kit. Although this product is not considered particularly toxic or dangerous in conditions of normal use, refer to the following for maximum safety :

#### ***Recommendations and precautions***

This kit contains potentially hazardous components. Though kit reagents are not classified being irritant to eyes and skin we recommend to avoid contact with eyes and skin and wear disposable gloves.

**WARNING !** Calibrators, Controls and Buffers contain sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) as a preservative.  $\text{NaN}_3$  may be toxic if ingested or adsorbed by skin or eyes.  $\text{NaN}_3$  may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Please refer to decontamination procedures as outlined by CDC or other local/national guidelines.

Do not smoke, eat or drink when manipulating the kit.

Do not pipette by mouth.

All human source material used for some reagents of this kit (controls, standards e.g.) has been tested by approved methods and found negative for HbsAg, Hepatitis C and HIV 1. However, no test can guarantee the absence of viral agents in such material completely. Thus handle kit controls, standards and patient samples as if capable of transmitting infectious diseases and according to national requirements.

### 5.2 General directions for use

Do not mix or substitute reagents or microplates from different lot numbers. This may lead to variations in the results.

Allow all components to reach room temperature (20-32°C/68-89.6°F) before use, mix well and follow the recommended incubation scheme for an optimum performance of the test.

**Incubation: We recommend test performance at 30°C/86°F for automated systems.**

Never expose components to higher temperature than 37°C/ 98.6 °F.

Always pipette substrate solution with brand new tips only. Protect this reagent from light. Never pipette conjugate with tips used with other reagents prior.

**A definite clinical diagnosis should not be based on the results of the performed test only, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated. The diagnosis is to be verified using different diagnostic methods.**

## 6. Sample Collection, Handling and Storage

---

Use preferentially freshly collected serum samples. Blood withdrawal must follow national requirements.

Do not use icteric, lipemic, hemolysed or bacterially contaminated samples. Sera with particles should be cleared by low speed centrifugation (<1000 x g). Blood samples should be collected in clean, dry and empty tubes. After separation, the serum samples should be used immediately, respectively stored tightly closed at 2-8°C/35-46°F up to three days, or frozen at -20°C/-4°F for longer periods.

## 7. Assay Procedure

---

### 7.1 Preparations prior to pipetting

Dilute concentrated reagents:

Dilute the concentrated sample buffer 1:5 with distilled water (e.g. 20 ml plus 80 ml).

Dilute the concentrated wash buffer 1:50 with distilled water (e.g. 20 ml plus 980 ml).

#### **Samples:**

Dilute serum samples 1:101 with sample buffer (1x)

e.g. 1000 µl sample buffer (1x) + 10 µl serum. Mix well !

#### **Washing:**

Prepare 20 ml of diluted wash buffer (1x) per 8 wells or 200 ml for 96 wells

e.g. 4 ml concentrate plus 196 ml distilled water.

#### **Automated washing:**

Consider excess volumes required for setting up the instrument and dead volume of robot pipette.

#### **Manual washing:**

Discard liquid from wells by inverting the plate. Knock the microwell frame with wells downside vigorously on clean adsorbent paper. Pipette 300 µl of diluted wash buffer into each well, wait for 20 seconds. Repeat the whole procedure twice again.

#### **Microplates:**

Calculate the number of wells required for the test. Remove unused wells from the frame, replace and store in the provided plastic bag, together with desiccant, seal tightly (2-8°C/35-46°F).

### 7.2 Work flow

**For pipetting scheme see Annex A, for the test procedure see Annex B**

**We recommend pipetting samples and calibrators in duplicate.**

**Cut-off calibrator should be used for qualitative testing only.**

- Pipette 100 µl of each patient's diluted serum into the designated microwells.
- Pipette 100 µl calibrators OR cut-off calibrator and negative and positive controls into the designated wells.
- Incubate for 30 minutes at 20-32°C/68-89.6°F.
- Wash 3x with 300 µl washing buffer (diluted 1:50).
- Pipette 100 µl conjugate into each well.
- Incubate for 30 minutes at 20-32°C/68-89.6°F.
- Wash 3x with 300 µl washing buffer (diluted 1:50).
- Pipette 100 µl TMB substrate into each well.
- Incubate for 30 minutes at 20-32°C/68-89.6°F, protected from intense light.
- Pipette 100 µl stop solution into each well, using the same order as pipetting the substrate.
- Incubate 5 minutes minimum.
- Agitate plate carefully for 5 sec.
- Read absorbance at 450 nm (optionally 450/620 nm) within 30 minutes.



## 8. Quantitative and Qualitative Interpretation

For **quantitative interpretation** establish the standard curve by plotting the **optical density (OD) of each calibrator (y-axis)** with respect to the corresponding concentration values in **U/ml (x-axis)**. For best results we recommend log/lin coordinates and 4-Parameter Fit. From the OD of each sample, read the corresponding antibody concentrations expressed in **U/ml**.

Normal Range	Equivocal Range	Positive Results
< 12 U/ml	12 - 18 U/ml	>18 U/ml

### Example of a standard curve

We recommend pipetting calibrators in parallel for each run.

Calibrators IgG	OD 450/620 nm	CV % (Variation)
0 U/ml	0.046	2.4
3 U/ml	0.171	2.6
10 U/ml	0.372	1.0
30 U/ml	0.698	3.8
100 U/ml	1.456	0.4
300 U/ml	2.396	2.0

### Example of calculation

Patient	Replicate (OD)	Mean (OD)	Result (U/ml)
P 01	0.533/0.569	0.551	19.8
P 02	1.156/1.196	1.176	68.7

For lot specific data, see enclosed quality control leaflet. Medical laboratories might perform an in-house Quality Control by using own controls and/or internal pooled sera, as foreseen by EU regulations.

### **Do not use this example for interpreting patients results!**

Each laboratory should establish its own normal range based upon its own techniques, controls, equipment and patient population according to their own established procedures.

For qualitative interpretation read the optical density of the cut-off calibrator and the patient samples. Compare patient's OD with the OD of the cut-off calibrator. For qualitative interpretation we recommend to consider sera within a range of 20% around the cut-off value as equivocal. All samples with higher ODs are considered positive, samples with lower ODs are considered negative.

**Negative:**  $OD_{\text{patient}} < 0.8 \times OD_{\text{cut-off}}$

**Equivocal:**  $0.8 \times OD_{\text{cut-off}} \leq OD_{\text{patient}} \leq 1.2 \times OD_{\text{cut-off}}$

**Positive**  $OD_{\text{patient}} > 1.2 \times OD_{\text{cut-off}}$

## 9. Technical Data

---

<b>Sample material:</b>	serum
<b>Sample volume:</b>	10 µl of sample diluted 1:101 with 1x sample buffer
<b>Total incubation time:</b>	90 minutes at 20-32°C/68-89.6°F
<b>Calibration range:</b>	0-300 U/ml
<b>Analytical sensitivity:</b>	1.0 U/ml
<b>Storage:</b>	at 2-8°C/35-46°F use original vials, only
<b>Number of determinations:</b>	96 tests

## 10. Performance Data

---

### 10.1 Analytical sensitivity

Testing sample buffer 30 times on *DemeditecLKM-1 (REF7703)* gave an analytical sensitivity of 1.0 U/ml.

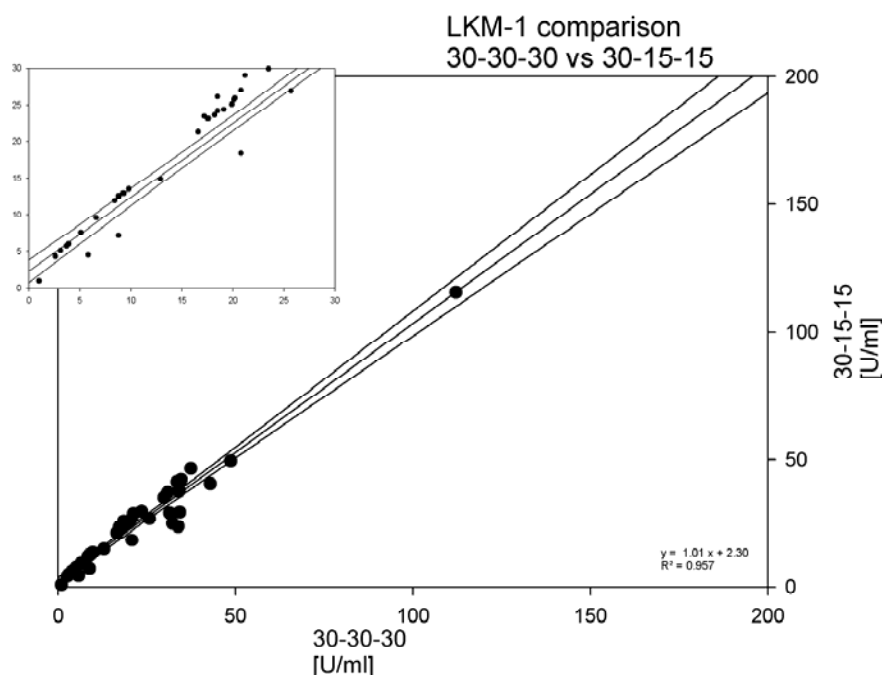
### 10.2 Specificity and sensitivity

The microplate is coated with **recombinant human cytochrome p450 IID6**.

No crossreactivities to other autoantigens have been found. Anti-LKM-1 antibodies show a diagnostic specificity of >99% for autoimmune hepatitis type 2. The diagnostic sensitivity of anti-LKM-1 antibodies for autoimmune hepatitis type 2 is 84%. The data has been acquired with the *Demeditec LKM-1 (REF7703)*.

### Correlation:

The comparability of performance data was assessed with 54 sera tested on both, *Demeditec DE7703* and *Demeditec DE3703*. A linear regression analysis of the two products showed that the two products are equivalent. Included in these sera are 39 sera close to cut-off.



### 10.3 Linearity

Chosen sera have been tested with this kit and found to dilute linearly. However, due to the heterogeneous nature of human autoantibodies there might be samples that do not follow this rule.

Sample No.	Dilution Factor	measured concentration (U/ml)	expected concentration (U/ml)	Recovery (%)
1	1 / 100	78.9	80.0	98.6
	1 / 200	39.8	40.0	99.5
	1 / 400	18.9	20.0	94.5
	1 / 800	9.6	10.0	96.0
2	1 / 100	34.2	33.0	103.6
	1 / 200	17.2	16.5	104.2
	1 / 400	8.1	8.3	97.6
	1 / 800	4.0	4.2	95.2

### 10.4 Precision

To determine the precision of the assay, the variability (intra and inter-assay) was assessed by examining its reproducibility on three serum samples selected to represent a range over the standard curve.

Intra-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	210.0	1.6
2	77.5	2.8
3	18.4	3.6

Inter-Assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	207.0	4.2
2	73.8	2.3
3	17.6	1.5

### 10.5 Calibration

Due the lack of international reference calibration this assay is calibrated in arbitrary units (U/ml).

## 11. Literature

- Krawitt EL (1996).**  
*Autoimmune Hepatitis.*  
N Engl J Med 334: 897-903.
- Meyer zum Büschenfelde KH, Lohse AW (1995).**  
*Autoimmune Hepatitis.*  
N Engl J Med 333: 1004-1005.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi et al. (1999).**  
*International Autoimmune Hepatitis Group Report: a review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis.*  
J Hepatol 31: 929-938.
- Manns MP et al. (1991).**  
*LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450 IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase.*  
J Clin Invest 88: 1370-1378.
- Homberg JC, Andre C, Abuaf A (1984).**  
*A new anti-liver-kidney microsoma antibody (anti-LKM-2) in tienilic acid-induced hepatitis.*  
Clin Exp Immunol 55: 561-570.
- Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, Johnson EF, Tukey RH, Manns MP (1994).**  
*Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D.*  
Lancet 344:578-81

## ANNEX A: Pipetting scheme

We suggest pipetting calibrators, controls and samples as follows:

For **quantitative interpretation** use calibrators to establish a standard curve.

For **qualitative interpretation** use cut-off calibrator.

	for <b>quantitative interpretation</b> use calibrators to establish a standard curve						for <b>qualitative interpretation</b> use cut-off calibrator					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	CalA	CalE	P1				NC	P2				
<b>B</b>	CalA	CalE	P1				NC	P2				
<b>C</b>	CalB	CalF	P2				CC	P3				
<b>D</b>	CalB	CalF	P2				CC	P3				
<b>E</b>	CalC	PC	P3				PC	...				
<b>F</b>	CalC	PC	P3				PC	...				
<b>G</b>	CalD	NC	...				P1	...				
<b>H</b>	CalD	NC	...				P1	...				

CalA: calibrator A, CalB: calibrator B, CalC: calibrator C, CalD: calibrator D, CalE: calibrator E, CalF: calibrator F

PC: positive control

NC: negative control

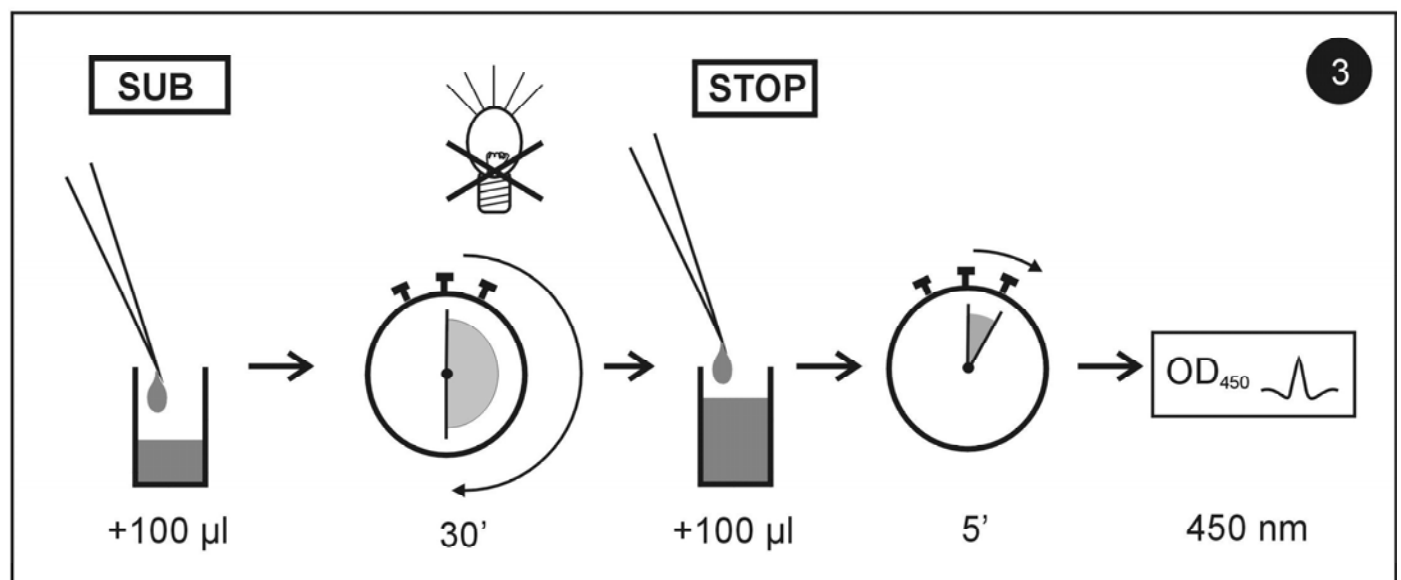
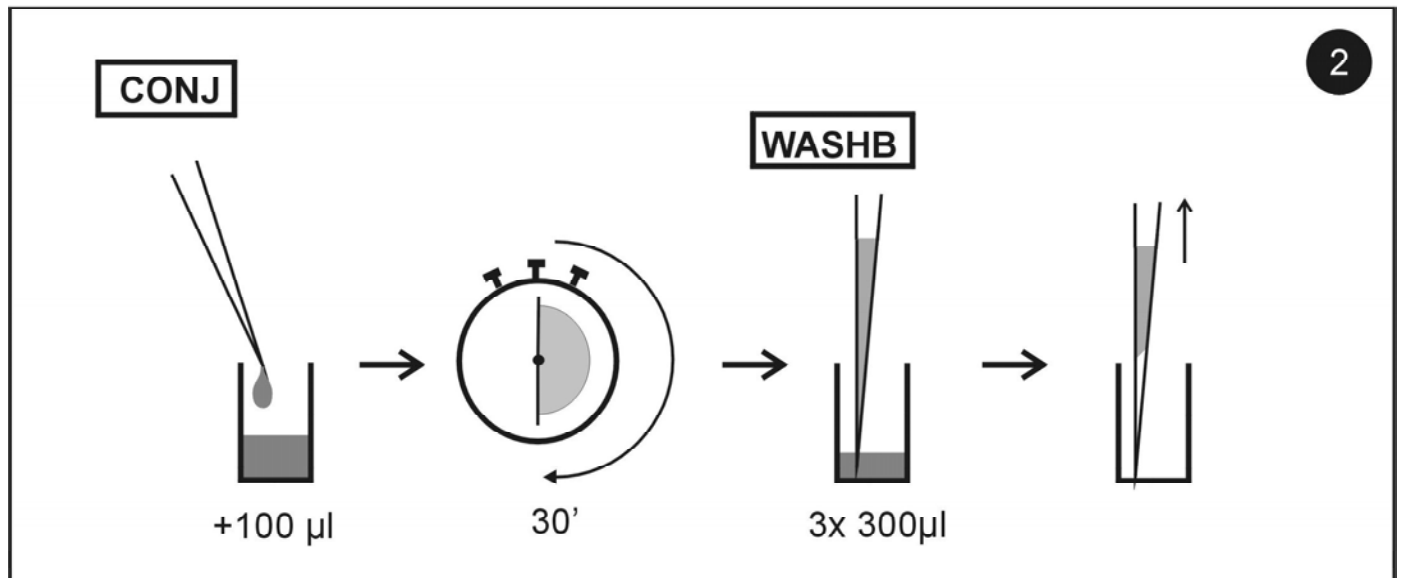
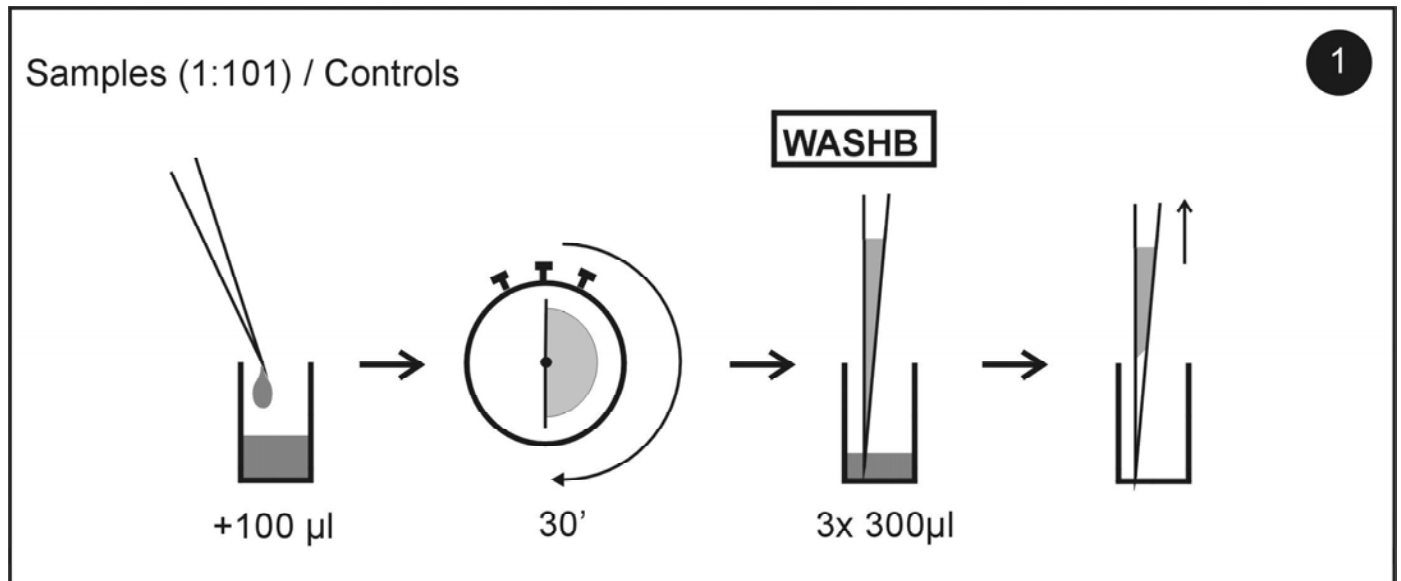
CC: Cut-off calibrator

P1: patient 1

P2: patient 2

P3: patient 3

## Annex B: Test Procedure



# Istruzioni per l'uso

## Indice

---

1. Finalità d'uso .....	1
2. Applicazione clinica e principio del test .....	1
3. Componenti del kit .....	2
4. Conservazione e stabilità .....	2
5. Avvertenze e misure precauzionali .....	3
6. Prelievo dei campioni, preparazione e conservazione .....	3
7. Esecuzione del test .....	4
8. Analisi quantitativa e qualitativa .....	5
9. Dati tecnici .....	5
10. Dati del test/Caratteristiche del test .....	6-7
11. Bibliografia .....	7
A : Schema di dispensazione .....	8
B : Procedura del test .....	9

## 1. Finalità d'uso

---

**Demeditec LKM-1** è un test immunoenzimatico in fase solida con citocromo p450 IID6 umano ricombinante per la determinazione quantitativa e qualitativa di anticorpi anti-microsomi epatici e renali (*liver-kidney microsomes*) nel siero umano.

Questo test serve per diagnosticare l'epatite autoimmune (AIH).

## 2. Applicazione clinica e principio del test

---

L'epatite autoimmune (AIH) è una malattia epatica progressiva cronica di origine sconosciuta, che risponde bene a terapia immunosoppressiva, ma che, se non curata, ha una prognosi negativa. Una diagnosi sicura e precoce riveste pertanto un ruolo di fondamentale importanza. L'AIH è caratterizzata dal quadro istologico di un'epatite periportale in assenza di marker virali, da un'ipergammaglobulinemia e, nella maggioranza dei pazienti, dalla presenza di autoanticorpi nel siero. Gli anticorpi anti nucleo (ANA), gli anticorpi anti muscolatura liscia (SMA, *smooth-muscle antibodies*), gli anticorpi anti microsomi epatici e renali (LKM, *liver kidney microsomes*) e gli anticorpi anti antigene epatico solubile (SLA, *soluble liver antigen*) sono anticorpi marcatori per l'AIH. Il 52% dei pazienti AIH è ANA e/o SMA positivo, il 20% SLA positivo e il 3% presenta anticorpi anti-LKM-1. Tutti questi anticorpi sono molto importanti per la diagnosi di un'AIH, tuttavia fino ad ora sono risultati altamente specifici per l'AIH solo gli autoanticorpi anti-SLA. Gli ANA/SMA vengono riscontrati nel 10-15% dei pazienti affetti da epatite virale o altre malattie immunomediate. Gli LKM-1 si trovano anche in pazienti con epatite C.

Gli anticorpi anti-LKM possono essere suddivisi in tre tipi in relazione ai rispettivi antigeni target. Gli anticorpi anti-LKM-1 sono diretti contro il citocromo p450 IID6, una proteina citoplasmatica di 50 kDa che si trova negli epatociti e nei tubuli renali prossimali. Gli anticorpi-LKM-2 sono associati all'epatite indotta da ticrynafen. L'antigene target degli LKM-2 è il citocromo p450 IIC9, un isoenzima del citocromo p450, che induce l'ossidazione metabolica del farmaco. Gli anticorpi anti-LKM-3 sono associati all'epatite cronica D e il loro antigene target è l'UDP-glucuronosil-transferasi.

L'AIH associata a LKM-1 insorge prevalentemente in età infantile, soprattutto nelle bambine di età compresa fra 2 e 14 anni. La determinazione degli anticorpi anti-LKM-1 è quindi di fondamentale importanza in pediatria.

### **Principio del test**

I campioni di siero diluiti 1:101 vengono incubati nei pozzetti sensibilizzati con l'antigene specifico. Gli anticorpi specifici nel siero del paziente, se presenti, si legano all'antigene legato alla fase solida; i componenti del siero non legati vengono separati nella successiva fase di lavaggio. Vengono quindi aggiunte immunoglobuline anti-immunoglobuline umane, marcate con perossidasi di rafano (coniugato), che, durante l'incubazione, si legano al complesso antigene-anticorpo precedentemente formatosi. Le immunoglobuline non legate vengono allontanate nella successiva fase di lavaggio. L'aggiunta di un cromogeno (TMB), provoca la formazione di un complesso colorato in blu; la successiva aggiunta di una soluzione acida provoca il blocco della reazione enzimatica e il viraggio del colore da blu a giallo. L'intensità del colore formato, misurata a 450 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-antigena in standard, campioni e controlli.

### 3. Componenti del kit

---

#### Da diluire prima dell'uso:

Tampone per la diluizione dei campioni 5 x :

1 flacone, 20 mL - concentrato 5x (tappo bianco: soluzione di colore giallo)

Componenti: Tris, NaCl, BSA, sodio azide < 0,1 % (conservante)

Tampone di lavaggio 50 x: 1 flacone, 20 mL - concentrato 50x (tappo bianco: soluzione di colore verde)

Componenti: Tris, NaCl, Tween 20, sodio azide < 0,1 % (conservante)

#### Pronti per l'uso:

Controllo negativo

1 flacone, 1,5 mL (tappo verde: soluzione di colore giallo)

Componenti: Siero umano (diluito), sodio azide < 0,1 % (conservante)

Controllo positivo

1 flacone, 1,5 mL (tappo rosso: soluzione di colore giallo)

Componenti: Siero umano (diluito), sodio azide < 0,1 % (conservante)

Calibratore cut-off

1 flacone, 1,5 mL (tappo blu: soluzione di colore giallo)

Componenti: Siero umano (diluito), sodio azide < 0,1 % (conservante)

Calibratori

6 flaconi, rispettivamente 1,5 mL con 0, 3, 10, 30, 100, 300 U/mL

(i calibratori provocano uno sviluppo di colore di intensità crescente con la concentrazione: soluzione di colore giallo)

Componenti: Siero umano (diluito), sodio azide < 0,1 % (conservante)

Coniugato

1 flacone, 15 mL IgG (tappo blu: di colore blu)

Componente: Immunoglobuline anti-immunoglobuline umana marcata con perossidasi di rafano

Substrato TMB

1 flacone, 15 mL (tappo nero)

Componente: TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stabilizzata

Soluzione di stop

1 flacone, 15 mL (tappo bianco: soluzione incolore)

Componente: acido cloridrico 1M

Microstrip

12 x 8 pozzetti, frazionabili singolarmente.

Per il rivestimento si veda il punto 1

#### Materiale occorrente:

Lettori di piastre microtitolo da 450 nm per la lettura di filtri e filtri opzionali di riferimento da 620 nm (600-690 nm). Recipienti in vetro (cilindri da 100-1000mL), tubi da test per diluizioni, Mixer Vortex, pipette di precisione (10, 100, 200, 500, 1000 µL) o pipette multiple regolabili (100-1000µL). Dispositivo di lavaggio delle micropiastre (pipetta ripetitrice o multicanale 300 µL o sistema automatizzato), carta assorbente.

I nostri test sono stati studiati per essere eseguiti con acqua depurata, conformemente alle disposizioni della Farmacopea degli Stati Uniti (USP 26 - NF 21) e della Farmacopea Europea (Eur.Ph. 4° ed.).

### 4. Conservazione e stabilità

---

I reagenti del kit e la micropiastra devono essere conservati a 2-8°C/35-46°F nei rispettivi flaconi originali. Le soluzioni diluite sono stabili per un mese a 4°C. Rispettare le date di scadenza specificate sulla confezione e sulle etichette dei singoli componenti.

**Non utilizzare componenti scaduti! Evitare di esporre la soluzione di substrato TMB alla luce diretta. Conservare le micropiastre sempre chiuse nella relativa pellicola d'imballaggio provvista di bustina di agente essiccante.**



## 5. Avvertenze e misure precauzionali

---

### 5.1 Rischio per la salute

**QUESTO PRODOTTO DEVE ESSERE UTILIZZATO ESCLUSIVAMENTE PER DIAGNOSI IN VITRO.**

L'impiego è riservato al personale che è stato debitamente informato e istruito sull'uso della diagnosi in vitro. Se si seguono le presenti istruzioni per l'uso, i reagenti contenuti in questo kit non sono classificabili né come tossici né come pericolosi per la salute, tuttavia, per garantire la massima sicurezza, è opportuno che l'utilizzatore osservi le seguenti precauzioni:

#### **Raccomandazioni e misure precauzionali**

I componenti del kit contengono reagenti potenzialmente irritanti per occhi, mucose o cute.

**ATTENZIONE!** Calibratori, trattamenti e tamponi contengono sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ) come conservante.  $\text{NaN}_3$  può risultare tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi.  $\text{NaN}_3$  può reagire con piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Dopo averlo gettato, risciacquare con una grande quantità di acqua per impedire la formazione di azidi. Si prega di fare riferimento alle procedure di decontaminazione citate dal CDC o a altre linee guida locali o nazionali.

Non mangiare, bere o fumare durante la manipolazione del kit.

Non utilizzare pipette a bocca. Indossare guanti monouso.

I reagenti di origine umana contenuti in questo kit (controlli e calibratori) sono stati testati e trovati negativi per l'antigene superficiale dell'epatite B (HbsAg), l'epatite C e l'HIV 1 e 2. Tuttavia, nei prodotti di origine umana non si può escludere con assoluta sicurezza la presenza degli agenti patogeni indicati o di altri agenti patogeni, eventualmente non ancora noti o diagnosticati. Pertanto i controlli, i calibratori e i sieri dei pazienti sono da considerarsi potenzialmente infettivi e, di conseguenza, da manipolarsi secondo le disposizioni vigenti.

### 5.2 Avvertenze di natura generale

Non utilizzare reagenti di lotti diversi; prestare attenzione alla corretta calibrazione delle pipette e delle attrezzature di laboratorio. Cambiare puntale per ogni reattivo, standard, controllo o campione.

Prima di cominciare il test portare tutti i componenti del kit a temperatura ambiente (20-32°C/68-89,6°F) e miscelarli accuratamente. Rispettare rigorosamente il protocollo prescritto per l'esecuzione del test.

**Incubazione: in sistemi automatizzati si raccomanda di eseguire il test a 30°C/86°F.**

Non esporre mai i singoli componenti del kit a temperature superiori a 37°C/ 98,6°F.

Dispensare la soluzione di substrato sempre con puntali nuovi per evitare eventuali contaminazioni. Evitare di esporre la soluzione di substrato alla luce solare diretta. Non dispensare mai la soluzione di coniugato con puntali contaminati da altri reagenti.

**La diagnosi clinica definitiva non deve basarsi esclusivamente sui risultati di questo test, ma deve essere formulata dal medico tenendo conto di tutti i risultati clinici e di altri esami di laboratorio. La diagnosi deve essere verificata sulla base di diversi metodi diagnostici.**

## 6. Prelievo dei campioni, preparazione e conservazione

---

Si raccomanda l'impiego di campioni di siero appena prelevati. Il prelievo di sangue deve avvenire secondo le disposizioni vigenti.

Non utilizzare campioni di siero itterici, lipemici, emolizzati o batteriologicamente contaminati. Centrifugare i campioni torbidi (<1000 x g).

Prelevare i campioni di sangue in provette pulite, asciutte e vuote. Dopo il prelievo utilizzare direttamente il siero. I campioni di siero possono essere conservati a 2-8°C/35-46°F per due-tre giorni. Se si prevede un periodo di conservazione più lungo, occorre congelare i campioni a -20°C.

## 7. Esecuzione del test

---

### 7.1 Preparazione

#### **Diluizione dei reagenti concentrati:**

Diluire il tampone concentrato per la diluizione dei campioni 1:5 con acqua distillata (ad es. 20 mL e 80 mL).

Diluire i tamponi di lavaggio concentrati 1:50 con acqua distillata (ad es. 20 mL e 980 mL).

#### **Diluizioni dei campioni dei pazienti:**

Diluire i campioni di siero 1:101 con tampone campione diluito (1x) e miscelare (ad es. 1000 µL di tampone concentrato per la diluizione dei campioni + 10 µL di siero).

#### **Lavaggio:**

Sono necessari 20 mL di tampone di lavaggio diluito (1x) ogni 8 pozzetti oppure 200 mL ogni 96 pozzetti (ad es. 4 mL di concentrato e 196 mL di acqua distillata).

#### **Lavaggio automatizzato:**

Per la messa in funzione dello strumento e il volume morto sono da prevedersi quantità di tampone di lavaggio supplementari.

#### **Lavaggio manuale:**

Rimuovere accuratamente il liquido battendo la piastra su carta da filtro. Dispensare 300 µL di tampone di lavaggio diluito in ogni pozzetto e attendere 20 secondi. Ripetere l'operazione altre due volte.

#### **Micropiastra:**

Rimuovere i pozzetti non utilizzati e conservarli accuratamente chiusi nella busta richiudibile con bustina di agente essiccante (2-8°C/35-46°F).

### 7.2 Fasi del test

**Rispettare lo schema di dispensazione indicato nell'allegato A e la procedura del test indicata nell'allegato B**  
**Si raccomanda di raccogliere campioni e controlli di riserva servendosi delle apposite pipette**  
**Il calibratore cut off deve essere utilizzato solo per test qualitativi**

- Dispensare 100 µL dei sieri diluiti nei rispettivi pozzetti.
- Dispensare 100 µL dei calibratori/ del calibratore cut-off e del controllo negativo e positivo nei pozzetti.
- Incubare per 30 minuti a temperatura 20-32°C/68-89,6°F.
- Lavare 3 volte rispettivamente con 300 µL di tampone di lavaggio diluito 1:50.
- Aggiungere 100 µL di soluzione di coniugato enzimatico in ogni pozzetto.
- Incubare per 30 minuti a temperatura 20-32°C/68-89,6°F.
- Lavare 3 volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito 1:50.
- Dispensare 100 µL di soluzione di substrato TMB in ogni pozzetto.
- Incubare per 30 minuti a temperatura 20-32°C/68-89,6°F, proteggere da sorgenti luminose intense.
- Dispensare 100 µL di soluzione di stop in ogni pozzetto rispettando la successione in cui è stato aggiunto il substrato.
- Incubare per almeno 5 minuti.
- Agitare delicatamente la piastra per 5 secondi.
- Misurare la densità ottica a 450 nm entro 30 minuti (filtro di riferimento: 620 nm).

## 8. Analisi quantitativa e qualitativa

Per l'**analisi quantitativa** dei campioni riportare in ordinata (asse delle y) la media dei valori delle OD degli standard e in ascissa (asse delle x) le rispettive concentrazioni in U/mL. Si consiglia di utilizzare l'elaborazione a 4 parametri in scala log/lin. Dalla DO (densità ottica) di ogni campione, leggere la corrispondente concentrazione anticorpale espressa in U/mL.

Range normale	Intermedio	Risultati positivi
< 12 U/mL	12 - 18 U/mL	>18 U/mL

### Esempio di analisi

Si raccomanda di tracciare la curva standard per ogni dosaggio.

Calibratori IgG	OD 450/620 nm	CV % (varianza)
0 U/mL	0,046	2,4
3 U/mL	0,171	2,6
10 U/mL	0,372	1,0
30 U/mL	0,698	3,8
100 U/mL	1,456	0,4
300 U/mL	2,396	2,0

### Esempio di calcolo

Paziente	Replicati (OD)	Media (OD)	Risultato (U/mL)
P 01	0,533/0,569	0,551	19,8
P 02	1,156/1,196	1,176	68,7

Si prega di desumere i dati specifici dei lotti dal certificato di controllo allegato. I laboratori di analisi sono tenuti ad eseguire controlli di qualità interni con propri controlli e/o pool di sieri ai sensi della regolamentazione UE.

### **Questi controlli non devono essere utilizzati per l'interpretazione dei risultati dei pazienti!**

È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri range di riferimento normali sulla base di propri metodi, controlli, attrezzatura e popolazione di pazienti.

Per l'interpretazione qualitativa leggere la densità ottica del calibratore cut off e dei sieri dei pazienti. Confrontare le D.O. dei campioni con le D.O. del calibratore cut off. Per l'interpretazione qualitativa si raccomanda di considerare come equivoci i sieri con un range intorno al 20% del valore di cut off. Tutti i campioni con D.O. più alte sono considerati positivi, campioni con D.O. più basse sono considerati negativi.

**Negativo:**  $OD_{\text{paziente}} < 0,8 \times OD_{\text{cut-off}}$

**Equivoco:**  $0,8 \times OD_{\text{cut-off}} \leq OD_{\text{patient}} \leq 1,2 \times OD_{\text{cut-off}}$

**Positivo:**  $OD_{\text{paziente}} > 1,2 \times OD_{\text{cut-off}}$

## 9. Dati tecnici

<b>Materiale del campione:</b>	Siero
<b>Volume del campione:</b>	10 µL di siero per diluizione 1:101 con 1x tampone per la diluizione dei campioni diluito
<b>Tempo totale di incubazione:</b>	90 minuti a temperatura ambiente 20-32°C/68-89,6°F
<b>Range di misura:</b>	0-300 U/mL
<b>Sensibilità analitica:</b>	1,0 U/mL
<b>Conservazione:</b>	a 2-8°C/35-46°F nei flaconi originali
<b>Numero di determinazioni:</b>	96 test

## 10. Dati del test/Caratteristiche del test

### 10.1 Sensibilità analitica

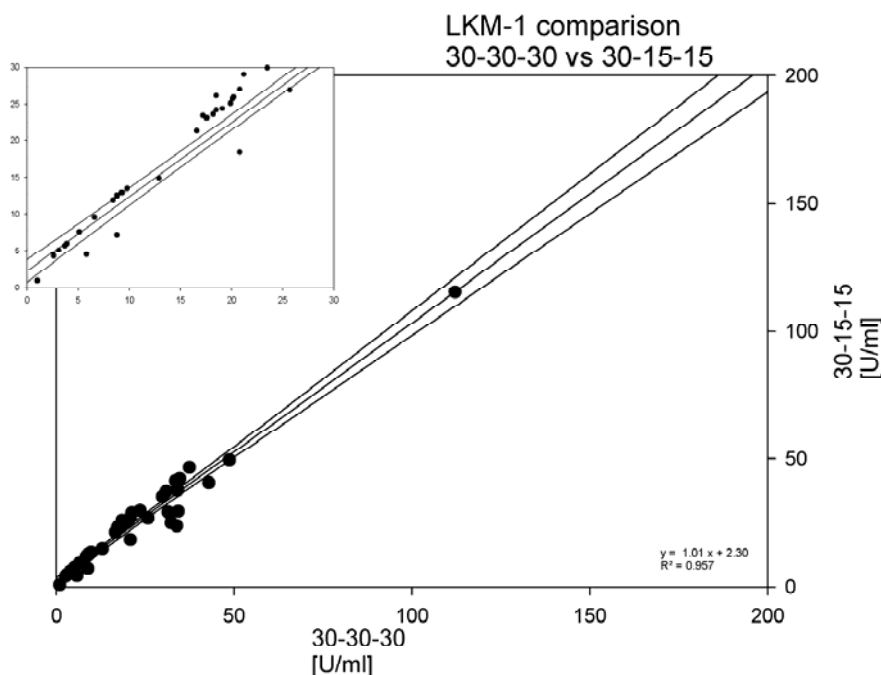
Testando i tamponi campione per 30 volte su *Demeditec LKM-1 (REF7703)* si garantisce una sensibilità analitica di 1,0 U/mL.

### 10.2 Specificità e sensibilità

La micropiastra è rivestita con **citocromo p450 IID6 umano ricombinante**. Non è stata stabilita una cross-reattività con altri antigeni. Gli anticorpi anti-LKM-1 presentano una specificità diagnostica >99% per l'epatite autoimmune tipo 2 e una sensibilità diagnostica all'incirca dell'84%. I dati sono stati acquisiti con *Demeditec LKM-1 (REF7703)*.

Correlazione:

La comparabilità di questi dati è stata accertata da 54 test serici sia su *Demeditec DE7703* sia su *Demeditec DE3703*. Un'analisi di regressione lineare dei due prodotti ha mostrato che gli stessi sono equivalenti. Tra questi sieri ne sono presenti 39 vicini al taglio.



### 10.3 Linearità

Per sieri selezionati questo test ha permesso di stabilire una correlazione lineare fra la diluizione e la concentrazione di anticorpi. Tuttavia, data l'eterogeneità degli anticorpi umani non è da escludersi che alcuni sieri possano presentare un comportamento non lineare.

Campioni n°	Diluizione	Concentrazione misurata (U/mL)	Concentrazione prevista (U/mL)	Recupero (%)
1	1 / 100	78,9	80,0	98,6
	1 / 200	39,8	40,0	99,5
	1 / 400	18,9	20,0	94,5
	1 / 800	9,6	10,0	96,0
2	1 / 100	34,2	33,0	103,6
	1 / 200	17,2	16,5	104,2
	1 / 400	8,1	8,3	97,6
	1 / 800	4,0	4,2	95,2

### 10.4 Precisione

Per controllare la precisione di dosaggio è stata calcolata la varianza intra e inter-saggio con tre sieri in diversi settori della curva standard.

Varianza intra-dosaggio		
Campioni n°	Media (U/mL)	CV (%)
1	210,0	1,6
2	77,5	2,8
3	18,4	3,6

Varianza inter-dosaggio		
Campioni n°	Media (U/mL)	CV (%)
1	207,0	4,2
2	73,8	2,3
3	17,6	1,5

### 10.5 Calibratura

Mancando uno standard di riferimento internazionale, il sistema di misura quantitativo è calibrato in unità arbitrari. I risultati vengono espressi in U/mL.

## 11. Bibliografia

- Krawitt EL (1996).**  
*Autoimmune Hepatitis.*  
N Engl J Med 334: 897-903.
- Meyer zum Büschenfelde KH, Lohse AW (1995).**  
*Autoimmune Hepatitis.*  
N Engl J Med 333: 1004-1005.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi et al. (1999).**  
*International Autoimmune Hepatitis Group Report: a review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis.*  
J Hepatol 31: 929-938.
- Manns MP et al. (1991).**  
*LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450 IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase.*  
J Clin Invest 88: 1370-1378.
- Homberg JC, Andre C, Abuaf A (1984).**  
*A new anti-liver-kidney microsome antibody (anti-LKM-2) in tienilic acid-induced hepatitis.*  
Clin Exp Immunol 55: 561-570. :
- Philipp T, Durazzo M, Trautwein C, Alex B, Straub P, Lamb JG, Johnson EF, Tukey RH, Manns MP (1994).**  
*Recognition of uridine diphosphate glucuronosyl transferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D.*  
Lancet 344:578-81.

## ALLEGATO A: Schema di dispensazione

Consigliamo di dispensare i calibratori, i controlli e i campioni come di seguito indicato:

Per l'analisi quantitativa utilizzare i calibratori per creare una curva standard.

Per l'analisi qualitativa utilizzare il calibratore cut-off.

	for <b>quantitative interpretation</b> use calibrators to establish a standard curve						for <b>qualitative interpretation</b> use cut-off calibrator					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CalA	CalE	P1				NC	P2				
B	CalA	CalE	P1				NC	P2				
C	CalB	CalF	P2				CC	P3				
D	CalB	CalF	P2				CC	P3				
E	CalC	PC	P3				PC	...				
F	CalC	PC	P3				PC	...				
G	CalD	NC	...				P1	...				
H	CalD	NC	...				P1	...				

CalA: calibrator A, CalB: calibrator B, CalC: calibrator C, CalD: calibrator D, CalE: calibrator E, CalF: calibrator F

PC: positive control

NC: negative control

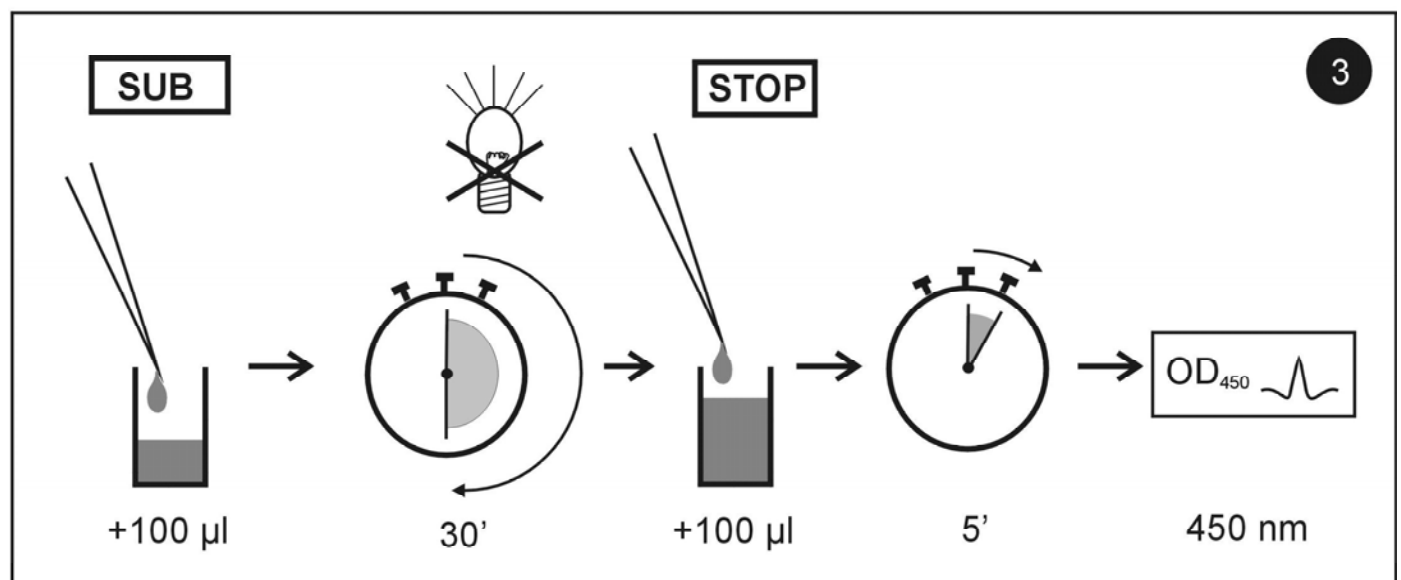
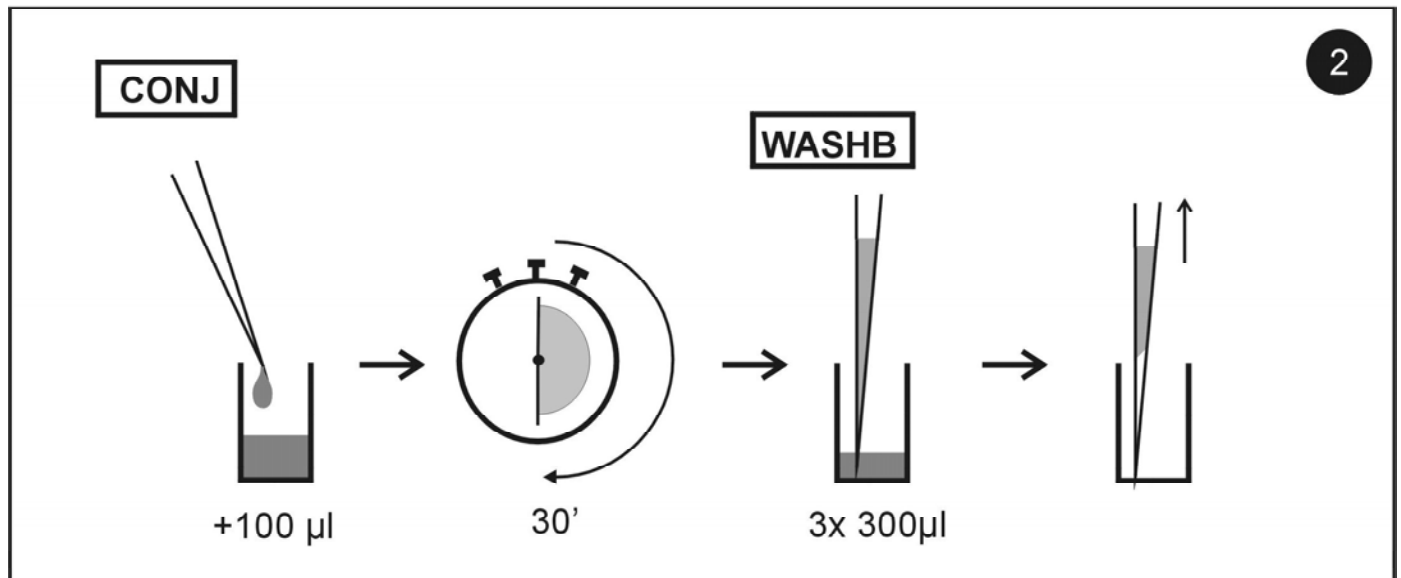
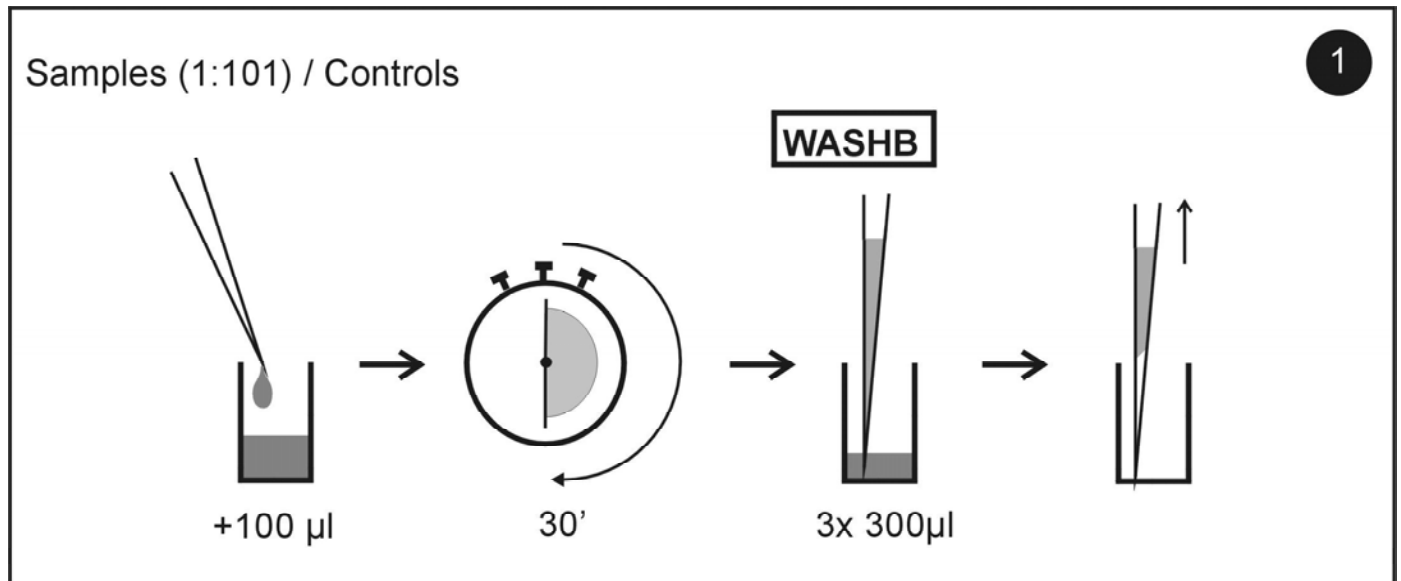
CC: Cut-off calibrator





















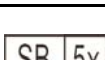
P1: patient 1

P2: patient 2

P3: patient 3

## Annex B: Procedura del test



	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Diagnosi in vitro</li> <li>◆ Pour diagnostic in vitro</li> <li>◆ In Vitro Diagnostikum</li> <li>◆ Para uso Diagnóstico in vitro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ For in vitro diagnostic use</li> <li>◆ Para uso diagnóstico in vitro</li> <li>◆ In Vitro Διαγνωστικό μέσο</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Numero d'ordine</li> <li>◆ Référence Catalogue</li> <li>◆ Bestellnummer</li> <li>◆ Número de catálogo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Catalogue number</li> <li>◆ Numéro de catálogo</li> <li>◆ Αριθμός παραγγελίας</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Descrizione lotto</li> <li>◆ Lot</li> <li>◆ Chargen Bezeichnung</li> <li>◆ Lote</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Lot</li> <li>◆ Lote</li> <li>◆ Χαρακτηρισμός παρτίδας</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Conformità europea</li> <li>◆ Déclaration CE de Conformité</li> <li>◆ Europäische Konformität</li> <li>◆ Declaração CE de Conformidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ EC Declaration of Conformity</li> <li>◆ Declaración CE de Conformidad</li> <li>◆ Ευρωπαϊκή συμφωνία</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 96 determinazioni</li> <li>◆ 96 tests</li> <li>◆ 96 Bestimmungen</li> <li>◆ 96 Testes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 96 tests</li> <li>◆ 96 pruebas</li> <li>◆ 96 προσδιορισμοί</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Rispettare le istruzioni per l'uso</li> <li>◆ Voir les instructions d'utilisation</li> <li>◆ Gebrauchsanweisung beachten</li> <li>◆ Ver as instruções de uso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ See instructions for use</li> <li>◆ Ver las instrucciones de uso</li> <li>◆ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Da utilizzarsi entro</li> <li>◆ Utilise avant le</li> <li>◆ Verwendbar bis</li> <li>◆ Utilizar antes de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Use by</li> <li>◆ Utilizar antes de</li> <li>◆ Χρήση μέχρι</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Conservare a 2-8°C</li> <li>◆ Conserver à 2-8°C</li> <li>◆ Lagerung bei 2-8°C</li> <li>◆ Conservar entre 2-8°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Store at 2-8°C (35-46°F)</li> <li>◆ Conservar a 2-8°C</li> <li>◆ Φυλάσσεται στους 2-8°C</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Prodotto da</li> <li>◆ Fabriqué par</li> <li>◆ Hergestellt von</li> <li>◆ Fabricado por</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Manufactured by</li> <li>◆ Fabricado por</li> <li>◆ Κατασκευάζεται από</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Calibratore cut-off</li> <li>◆ Etalon Seuil</li> <li>◆ Grenzwert Kalibrator</li> <li>◆ Calibrador de cut-off</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Cut off Calibrator</li> <li>◆ Calibrador de cut-off</li> <li>◆ Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Controllo positivo</li> <li>◆ Contrôle Positif</li> <li>◆ Positiv Kontrolle</li> <li>◆ Controllo positivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Positive Control</li> <li>◆ Control Positivo</li> <li>◆ Θετικός ορός ελέγχου</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Controllo negativo</li> <li>◆ Contrôle Négatif</li> <li>◆ Negativ Kontrolle</li> <li>◆ Controllo negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Negative Control</li> <li>◆ Control Negativo</li> <li>◆ Αρνητικός ορός ελέγχου</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Calibratore</li> <li>◆ Etalon</li> <li>◆ Kalibrator</li> <li>◆ Calibrador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Calibrator</li> <li>◆ Calibrador</li> <li>◆ Αντιδραστήριο βαθμονόμησης</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Recupero</li> <li>◆ Corrélation</li> <li>◆ Wiederfindung</li> <li>◆ Recuperação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Recovery</li> <li>◆ Recuperado</li> <li>◆ Ανάκτηση</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Coniugato</li> <li>◆ Conjugé</li> <li>◆ Konjugat</li> <li>◆ Conjugado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Conjugate</li> <li>◆ Conjugado</li> <li>◆ Σύζευγμα</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Micropiastra rivestita</li> <li>◆ Microplaque sensibilisée</li> <li>◆ Beschichtete Mikrotiterplatte</li> <li>◆ Microplaca revestida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Coated microtiter plate</li> <li>◆ Microplaca sensibilizada</li> <li>◆ Επικαλυμμένη μικροπλάκα</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Piastra ad aghi rivestita</li> <li>◆ Pinplate sensibilisée</li> <li>◆ Beschichtete Pinplatte</li> <li>◆ Pinplate revestida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Coated pinplate</li> <li>◆ Pinplate sensibilizada</li> <li>◆ Επικαλυμμένη πλάκα Pin</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Tampone di lavaggio</li> <li>◆ Tampon de Lavage</li> <li>◆ Waschpuffer</li> <li>◆ Solução de lavagem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Wash buffer</li> <li>◆ Solución de lavado</li> <li>◆ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Tampone substrato</li> <li>◆ Substrat</li> <li>◆ Substratpuffer</li> <li>◆ Substrato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Substrate buffer</li> <li>◆ Tampón sustrato</li> <li>◆ Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Reagente bloccante</li> <li>◆ Solution d'Arrêt</li> <li>◆ Stopreagenz</li> <li>◆ Solução de paragem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Stop solution</li> <li>◆ Solución de parada</li> <li>◆ Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Tampone campione</li> <li>◆ Tampon Echantillons</li> <li>◆ Probenpuffer</li> <li>◆ Diluente de amostra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Sample buffer</li> <li>◆ Tampón Muestras</li> <li>◆ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων</li> </ul>