

SeraSpot® HepAk-7 IgG

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG-Antikörpern bei autoimmunen Lebererkrankungen
in humanem Serum oder Plasma

 SP-004-7 G-S6  48  SP-004-7 G-S12  96  SP-004-7 G-S24  2x 96
 *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

Bei den autoimmunen Lebererkrankungen unterscheidet man zwischen Autoimmunhepatitis (AIH) Typ I und II, primärer biliärer Zirrhose (PBC) und der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC). Neben diesen klar definierten Krankheitsformen sind auch abweichende Varianten als Überlappungssyndrome von AIH und PBC bzw. PSC bekannt. Diese chronischen Erkrankungen unklarer Ätiologie können nach Jahren zur Entwicklung einer Leberzirrhose führen. Eine rechtzeitige Diagnose mit folgerichtiger Therapie kann eine derartige Entwicklung in vielen Fällen verhindern. Alle Lebererkrankungen sind in der Frühphase durch erhöhte Werte von Transaminasen charakterisiert. Hinzu können unspezifische Symptome wie Übelkeit, Müdigkeit, Gelenk- und Muskelschmerzen kommen. Für die Diagnose autoimmuner Lebererkrankungen sind nach Ausschluss einer viralen Hepatitis-Pathogenese der Nachweis von Autoantikörpern gegen spezifische Leberantigene von entscheidender Bedeutung. Eine frühzeitige Diagnose mit nachfolgender Therapie korreliert mit einer guten Prognose.

Der *SeraSpot®* HepAk-7 IgG Test ermöglicht einen schnellen und zuverlässigen Nachweis von wichtigen Autoantikörpern zur Diagnose und Differentialdiagnose autoimmuner Lebererkrankungen.

Literatur:

1. Klein, R., Berg, P., Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz. *Klein.Lab.* 39, 1993: 611-626
2. Kanzler, S., Weidemann, C., Gerken, G., Lohr, H.F., Galle, P.R., Meyer zum Buschfelde, K.H., Lohse, A.W., Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis., *J. Hepatol.* 31 (4), 1999: 635-640
3. Rust, C., Beuers, U., Overlap syndromes among autoimmune liver diseases *World J.Gastroenterol.* 14 (21), 2008: 3368-3373
4. Klein, R. Berg, P.A., Klinische Relevanz von Autoantikörpern bei chronischen Lebererkrankungen, In Conrad, K. (Hrsg.) *Autoantikörper: 464-491* Pabst Science Publishers Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb: 1998
5. Strassburg, C.P. et al.: S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen AWMF-Reg. Nr. 021-27 / Practical guideline autoimmune liver diseases AWMF-Reg. Nr. 021-27. *Z Gastroenterol* 55, 2017, 1135-1226

Anwendungsbereich

Der **SeraSpot® HepAk-7 IgG Test** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von Autoantikörpern vom IgG-Isotyp gegen folgende Antigene: AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, F-Actin, gp210 und Sp100 in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Der **SeraSpot® HepAk-7 IgG Test** ist ein Festphasenimmunoassay basierend auf der Verwendung von Antigenen, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Wells von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Autoantikörper, die bei autoimmunen Lebererkrankungen ausgebildet werden, dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun *SpotSight®* plate oder Seramun *SpotSight®* strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun *SpotSight®* scan quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete Autoantigene

Bezeichnung	Klinische Relevanz / Spezifität		Beschreibung
AMA-M2	PBC	95 %	M2-Protein des mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase(PDH)-Komplexes
LKM1	AIH II	95 – 100 %	“Liver-kidney microsomal antigen 1“, Cytochrom P450 2D6 (LKM 1 hp)
LC1	AIH II	50 %	Leber-Zytosol-Antigen Typ 1, Formiminotransferase Cyclodeaminase (62 kDa)
SLA	AIH I		“Soluble liver antigen“, 50 kDa UGA-Suppressor Serin-tRNA assoziiertes Protein
F-Actin	AIH I	wenig spezifisch	Polymerisierte Filamente des Aktin-Proteins
gp210	PBC	10 – 25 %; hochspezifisch	210 kDa Glycoprotein des Kernporenkomplexes
Sp100	PBC	30 %	„Speckled pattern 100“, Protein der “Kern-Punkte”

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen	
1	WELLS	Kavitäten mit Arrays	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
Farbmarkierung: Grün					
2	WASHBUF CONC 10X	Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL	Probenverdünnungs-puffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-POD-Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
5	SUBSTR TMB	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB	Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 8 Tage bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (z.B. 10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Fusselfreies Filterpapier
- Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung
- Becherglas und Messzylinder
- Stoppuhr
- Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional)
- Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- Seramun *SpotSight*® plate oder Seramun *SpotSight*® strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun *SpotSight*® scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

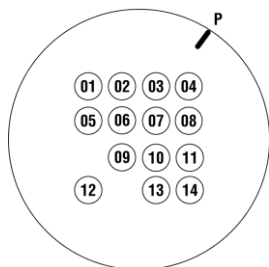
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1 : 101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer **DIL**.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen**. Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung (hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen**. Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung (hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrirte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers erfolgen.

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung

Arraylayout



Parameter	
05	LKM1
06	AMA-M2
07	LC1
09	SLA
10	Sp100
12	F-Actin
13	gp210

Kontrollen	
01	Positivkontrolle (PC)
02	Negativkontrolle (NC), 0 rel. Units
03	Cut-off Kontrolle (CO), 30 rel. Units
04	Referenz 3 (R3), 60 rel. Units
08	Referenz 2 (R2), 100 rel. Units
11	Referenz 1 (R1), 300 rel. Units
14	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO), entspricht 30 rel. Units. Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameter-spezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC), entspricht 0 rel. Units. Sehr schwach gefärbter Spot, die Färbeintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befinden hat. Ein Wegbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf Fehlen von Probe hin.
5. Referenz 1 (R1), entspricht 300 rel. Units. Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt.
6. Referenz 2 (R2), entspricht 100 rel. Units. Schwächere Färbung als der R1-Spot, immer angefärbt.
7. Referenz 3 (R3), entspricht 60 rel. Units. Schwächere Färbung als der R2-Spot, immer angefärbt.

Die Spots NC, CO, R1 ... R3 werden zur Erstellung einer Referenzkurve (4 Parameter nichtlineare Regression) verwendet, um die Färbeintensitäten der Antigen-spots in relativen Einheiten (rel. Units) auszudrücken.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 7. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	IgG
negativ	Farbintensität der Antigen-Spots \leq Cut-off Kontrolle
positiv	Farbintensität eines oder mehrerer Antigen-Spots $>$ Cut-off Kontrolle

Bei der Beurteilung des *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG (SP-004-7 G) Testergebnisses ist zu beachten, dass nach den S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen von 2017 für den Nachweis von Anti-F-Actin-Autoantikörpern vom IgG-Typ die Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenz empfohlen wird (5).

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontamination der Reagenzien oder der Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität

Serologisch vorcharakterisierte Proben (Referenztest 1) von Patienten mit dem Verdacht auf autoimmune Lebererkrankungen wurden im *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG Test untersucht („Initiale Sensitivität“). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum Nachweis von Antikörpern bei autoimmunen Lebererkrankungen nachgetestet (Referenztest 2), wobei die hier erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im *SeraSpot*[®]-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen („Berichtigte Sensitivität“).

LKM1	n = 8	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	8	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: 100 %

Berichtigte Sensitivität: 100 %

AMA-M2	n = 29	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	29	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: 100 %

Berichtigte Sensitivität: 100 %

LC1	n = 7	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	7	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: 100 %

Berichtigte Sensitivität: 100 %

SLA	n = 7	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	7	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: 100 %

Berichtigte Sensitivität: 100 %

Sp100	n = 18	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	18	0
	negativ	0	0

Initiale Sensitivität: 100 %

Berichtigte Sensitivität: 100 %

F-Actin	n = 13	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	12	0
	negativ	1	0

Initiale Sensitivität: 92,3 %

Berichtigte Sensitivität: 92,3 %

gp210	n = 19	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	18	0
	negativ	1	0

Initiale Sensitivität: 94,7 %

Berichtigte Sensitivität: 100 %

Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv von Blutspendersonen wurde im *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG Test untersucht („Initiale Spezifität“). Proben mit positiven Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum Nachweis von Antikörpern bei autoimmunen Lebererkrankungen nachgetestet, wobei die damit erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der Proben dienen („Berichtigte Spezifität“).

LKM1	n = 192	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	1
	negativ	0	191

Initiale Spezifität: **99,5 %**

Berichtigte Spezifität: **99,5 %**

AMA-M2	n = 192	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	1
	negativ	0	191

Initiale Spezifität: **99,5 %**

Berichtigte Spezifität: **99,5 %**

LC1	n = 192	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	1	2
	negativ	0	189

Initiale Spezifität: **99,0 %**

Berichtigte Spezifität: **99,0 %**

SLA	n = 192	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	192

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

Sp100	n = 191	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	0
	negativ	1	190

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

F-Actin	n = 182	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	182

Initiale Spezifität: **100 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

gp210	n = 191	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	1
	negativ	0	190

Initiale Spezifität: **99,5 %**

Berichtigte Spezifität: **99,5 %**

Kreuzreaktivität

Potentiell kreuzreaktive Proben wurden im *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG Test untersucht („Initiale Spezifität“) und mit einem zweiten Assay zum Autoantikörper-Nachweis von Lebererkrankungen nachuntersucht („Berichtigte Spezifität“).

HBV-positive Proben (Hepatitis-B-Virus)

HBV	n = 27	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	27

Initiale Spezifität: 100 %

Berichtigte Spezifität: 100 %

HCV-positive Proben (Hepatitis-C-Virus)

HCV	n = 43	Referenztest 1	
		positiv	negativ
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positiv	0	0
	negativ	0	43

Initiale Spezifität: 100 %

Berichtigte Spezifität: 100 %

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*® HepAk-7 IgG Test untersucht und die relativen Units (rel. Units) ermittelt. Aus den erhaltenen Werten wurden die Variationskoeffizienten (VK) als Maß für die Präzision innerhalb eines Testlaufs (Intra-Assay-VK), zwischen verschiedenen Testläufen (Inter-Assay-VK) und zwischen verschiedenen Testchargen (Inter-Chargen-VK) ermittelt.

	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Interbatch-VK	
	rel. Units \bar{x} n = 40	VK [%]	rel. Units \bar{x} n = 80	VK [%]	rel. Units \bar{x} n = 240	VK [%]
LKM1	58,2	5,3	84,8	12,3	86,2	12,6
AMA-M2	36,8	6,8	38,9	14,9	42,2	16,3
LC1	61,5	10,1	60,2	16,7	62,5	18,1
SLA	66,3	6,2	64,9	8,6	77,7	18,1
Sp100	88,6	6,2	84,7	11,4	92,4	18,7
F-Actin	53,8	14,7	59,0	15,3	51,2	19,9
gp210	52,9	6,4	51,2	8,8	49,9	13,8
Durchführung	1 Bearbeiter, 40x Bestimmung, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag 20 Tage, 1 Charge		5 Bearbeiter, 2x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag 20 Tage, 3 Chargen	

Automatisierbarkeit

Proben (n = 96) mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit dem Mikrotiterplatten-Prozessor DS2® (Dynex Technologies; manuelle Probenverdünnung) abgearbeitet. Aus den gemessenen Farbintensitäten der Spots (RAW) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

	Dynex DS2® vs. manuelle Abarbeitung
	r^2
LKM1	0,984
AMA-M2	0,988
LC1	0,971
SLA	0,990
Sp100	0,954
F-Actin	
gp210	0,994

r^2 wurde nicht ermittelt, wenn mehr als 90 % der Gesamtzahl (n = 96) der untersuchten Proben keine Antikörperreaktivität für die jeweiligen Antigene zeigten.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *In-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben 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 Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**













Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2020-01-20	Allgemein	Generelle Überarbeitung
	Einleitung	Aktualisierung
	Vorbereitung und Lagerung der Proben	Probenstabilität
	Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien	Lagerung gebrauchsfertiger Waschpuffer
	Testkomponenten	Aktualisierung
	Interpretation der Ergebnisse	Nachweis von Anti-F-Actin-Autoantikörpern
	Leistungsmerkmale	Aktualisierung der Daten

Inkubationsschema SeraSpot® HepAk-7 IgG

1.  100 µl
30 min
 3 x Waschen
Verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
2.  50 µl
30 min
 3 x Waschen
Konjugat **CONJ HRP IgG**
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
3.  50 µl
30 min
 Absaugen
Substratlösung **SUBSTR TMB**
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)
4.  Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse
Scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun
SpotSight® strip und Software Seramun
SpotSight® scan

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot® HepAk-7 IgG

Spotimmunoassay for detection of IgG antibodies in autoimmune liver diseases
in human serum or plasma

REF SP-004-7 G-S6 ▽ 48 REF SP-004-7 G-S12 ▽ 96 REF SP-004-7 G-S24 ▽ 2x 96
IVD *In-vitro*-diagnostic medical device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

Primary autoimmune liver disease (PAL) can be subdivided into autoimmune hepatitis (AIH) type I and II, primary biliary cirrhosis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC). Beside these clearly defined diseases, variant forms described as overlap syndrome additionally exist. These forms include characteristics of AIH and PBC or PSC. Clinical symptoms of PAL resemble that of other chronic liver diseases. The progress of chronic liver diseases may result in the development of liver cirrhosis. Only an early diagnosis and treatment may prevent such an outcome. In early stages liver diseases are characterized by increased levels of serum transaminases. Unspecific symptoms as sickness, fatigue and arthralgia can additionally occur. About 15 % of chronic liver disease cases underlie an autoimmune pathogenesis. Therefore the determination of different autoantibodies is recommended after exclusion of a virus hepatitis. The early therapy as a result of a correct diagnosis correlates with a positive prognosis.

The *SeraSpot*® HepAk-7 IgG test enables the fast determination of autoantibodies with diagnostic relevance for autoimmune liver diseases.

Literatur:

1. Klein, R., Berg, P., Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz. Klein.Lab. 39, 1993: 611-626
2. Kanzler, S., Weidemann, C., Gerken, G., Lohr, H.F., Galle, P.R., Meyer zum Buschfelde, K.H., Lohse, A.W., Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis., J. Hepatol. 31 (4), 1999: 635-640
3. Rust, C., Beuers, U., Overlap syndromes among autoimmune liver diseases World J.Gastroenterol. 14 (21), 2008: 3368-3373
4. Klein, R. Berg, P.A., Klinische Relevanz von Autoantikörpern bei chronischen Lebererkrankungen, In Conrad, K. (Hrsg.) Autoantikörper: 464-491 Pabst Science Publishers Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb: 1998
5. Strassburg, C.P. et al.: S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen AWMF-Reg. Nr. 021-27 / Practical guideline autoimmune liver diseases AWMF-Reg. Nr. 021-27. Z Gastroenterol 55, 2017, 1135-1226

Intended use

The *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG test is an *in vitro* diagnostic medical device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of autoantibodies of the IgG isotype to the following antigens: AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, F-Actin, gp210 and Sp100 in human serum or plasma.

Principle of the test

The *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant or purified native proteins / protein complexes as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96-well microtiter plates. The antigens serve as capture molecules for autoantibodies, which are formed in autoimmune liver diseases. Bound antibodies are detected by horseradish peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed as precipitated product from colorless substrate solution. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are sucked off and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with the anti-human IgG-HRP-conjugate for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is sucked off and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau[®] spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by sucking off the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight*[®] plate or Seramun *SpotSight*[®] strip scanner. The obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight*[®] scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used Autoantigens

Nomenclature	Clinical relevance / Specificity		Description
AMA-M2	PBC	95 %	M2 protein of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH) complex
LKM1	AIH II	95 – 100 %	"Liver-kidney microsomal antigen 1", cytochrome P450 2D6 (LKM 1 hp)
LC1	AIH II	50 %	Liver cytosol antigen type 1, formiminotransferase cyclodeaminase (62 kDa)
SLA	AIH I		Soluble liver antigen, 50 kDa UGA-suppressor serine tRNA associated protein
F-Actin	AIH I	Less specific	Polymerized filaments of the Actin protein.
gp210	PBC	10 – 25 % Highly specific	210 kDa glycoprotein of nuclear pore complex
Sp100	PBC	30 %	„Speckled pattern 100“, protein of “nuclear dots”

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations
1	WELLS Wells with arrays Color coding: green	6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips in frame separately vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10X Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cap
3	DIL Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap
4	CONJ HRP IgG Anti-human IgG- HRP- conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap
5	SUBSTR TMB Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap
6	COVER Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	6x2	12x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 8 days. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (e.g. 10 µl sample and 1000 µl buffer) with the ready-to-use sample diluent.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stopwatch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. 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 plate 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 wash solution by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or deionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Execution at room temperature (18...25 °C) and at the specified incubation times.

For the handling of SeraSpot® tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **SWAB** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

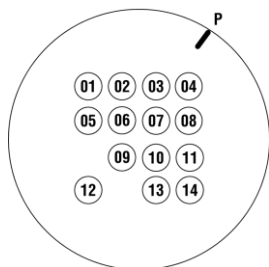
1. Warm all reagents and required wells **WELL** to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1 : 101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer **DIL**.
3. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **CONJ HRP IgG** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **COVER** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard conjugate), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **WASHBUF CONC 10X**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **SUBSTR TMB** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
11. Clean bottom of wells with swab **SWAB**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*® plate or the Seramun *SpotSight*® strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*® scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*® strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when stored in the dark.

Test evaluation

Array layout



Parameter	
05	LKM1
06	AMA-M2
07	LC1
09	SLA
10	Sp100
12	F-Actin
13	gp210

Controls	
01	Positive control (PC)
02	Negative control (NC), 0 rel. units
03	Cut-off control (CO), 30 rel. units
04	Reference 3 (R3), 60 rel. units
08	Reference 2 (R2), 100 rel. units
11	Reference 1 (R1), 300 rel. units
14	Serum control (SC)

P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO), corresponding to 30 rel. units. Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC), corresponding to 0 rel. units. Pale spot with intensity lower than cut-off control.
4. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.
5. Reference 1 (R1), corresponding to 300 rel. units. Intensively stained spot. Always stained.
6. Reference 2 (R2), corresponding to 100 rel. units. Intensity lower than R1. Always stained.
7. Reference 3 (R3), corresponding to 60 rel. units. Intensity lower than R2. Always stained.

The spots NC, CO, R1 ... R3 are used to create a reference curve (four parameter non-linear regression) to calculate the staining intensities of the spots in relative units (rel. units).

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 7 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun *SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed in accordance to the following classification:

Result Interpretation	IgG
negative	color intensity of antigen spot ≤ Cut-off control
positive	color intensity of antigen spot > Cut-off control

When evaluating the *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG (SP-004-7 G) results it should be noted that the S2k guideline on autoimmune liver diseases from 2017 recommends the detection of anti-F-Actin autoantibodies of the IgG type by indirect immunofluorescence (5).

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) do not interfere with the test. Rheumatoid factors also do not interfere with the test.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere underside the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity

Serologically predetermined samples (reference test 1) of patients with suspected inflammatory vascular disease were tested in the *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG test ("Initial sensitivity"). Samples with discrepant results were retested in a second assay (reference test 2) for detection of autoantibodies in systemic vasculitis. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity").

LKM1	n = 8	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	8	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

AMA-M2	n = 29	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	29	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

LC1	n = 7	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	7	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

SLA	n = 7	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	7	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

Sp100	n = 18	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	18	0
	negative	0	0

Initial sensitivity: 100 %

Amended sensitivity: 100 %

F-Actin	n = 13	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	12	0
	negative	1	0

Initial sensitivity: 92.3 %

Amended sensitivity: 92.3 %

gp210	n = 19	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	18	0
	negative	1	0

Initial sensitivity: 94.7 %

Amended sensitivity: 100 %

Diagnostic specificity

A collective of blood donor samples were tested by the *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG test ("Initial specificity"). Samples with positive results were retested in a second assay for detection of hepatitis autoantibodies. The results obtained were used for determination of the final status of the samples ("Amended specificity").

LKM1	n = 192	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	1
	negative	0	191

Initial specificity: 99.5 %

Amended specificity: 99.5 %

AMA-M2	n = 192	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	1
	negative	0	191

Initial specificity: 99.5 %

Amended specificity: 99.5 %

LC1	n = 192	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	1	2
	negative	0	189

Initial specificity: 99.0 %

Amended specificity: 99.0 %

SLA	n = 192	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	0
	negative	0	192

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

Sp100	n = 191	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	0
	negative	1	190

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

F-Actin	n = 182	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	0
	negative	0	182

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

gp210	n = 191	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	1
	negative	0	190

Initial specificity: 99.5 %

Amended specificity: 99.5 %

Cross-reactivity

Potential cross-reacting samples were tested in the *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG test ("Initial specificity") and followed up with a reference test ("Amended specificity").

HBV-positive samplings (hepatitis B virus)

HBV	n = 27	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	0
	negative	0	27

Initial specificity: 100 %

Amended specificity: 100 %

HCV-positive samplings (hepatitis C virus)

HCV	n = 43	reference test 1	
		positive	negative
<i>SeraSpot</i> [®] HepAk-7 IgG	positive	0	0
	negative	0	43

Initial specificity 100 %

Amended specificity: 100 %

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by SeraSpot® HepAk-7 IgG test. The staining intensities of spots were determined as relative units (rel. units) according to the reference curve and the variation coefficients (CV) were calculated in order to determine the within-run precision (intra-assay-CV), between-run precision (inter-assay-CV) and Lot-to-Lot precision (Interbatch-CV).

	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	rel. units $[\bar{x}]$ n = 40	CV [%]	rel. units $[\bar{x}]$ n = 80	CV [%]	rel. units $[\bar{x}]$ n = 240	CV [%]
LKM1	58.2	5.3	84.8	12.3	86.2	12.6
AMA-M2	36.8	6.8	38.9	14.9	42.2	16.3
LC1	61.5	10.1	60.2	16.7	62.5	18.1
SLA	66.3	6.2	64.9	8.6	77.7	18.1
Sp100	88.6	6.2	84.7	11.4	92.4	18.7
F-Actin	53.8	14.7	59.0	15.3	51.2	19.9
gp210	52.9	6.4	51.2	8.8	49.9	13.8
Procedure	1 operator, 40x determinations, 1 batch		5 operators, 2x determinations, 2x testings per day, 20 days, 1 batch		5 operators, 2x determinations, 2x testings per day, 20 days, 3 batches	

Automation

Samples (n = 96) of known antibody titer were assayed manually or by use of the microplate processor DS2® (Dynex Technologies; manual sample dilution). Color intensity of antigen spots was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r^2 for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

	Dynex DS2® vs. manual processing
	r^2
LKM1	0.984
AMA-M2	0.988
LC1	0.971
SLA	0.990
Sp100	0.954
F-Actin	
gp210	0.994

r^2 was not determined if more than 90 % of the total number (n = 96) of the samples showed no antibody reactivity for the particular antigens.

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8 °C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

In particular the following precautions should be observed:


- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**







History of changes


Version	Section	Modifications
2020-01-20	General	General revision
	Introduction	Update
	Preparation and storage of samples	Stability of samples
	Preparation and storage of reagents	Storage of ready-to-use wash solution
	Kit components	Update
	Result interpretation	detection of anti-F-Actin autoantibodies
	Performance characteristics	Update of data











Incubation scheme *SeraSpot*[®] HepAk-7 IgG

-  100 µl diluted sample (1 : 101)
30 min incubation (room temperature)

 3 x wash with wash solution, each 400 µl per well
-  50 µl conjugate **CONJ HRP IgG**
30 min incubation (room temperature)

 3 x wash with wash solution, each 400 µl per well
-  50 µl substrate **SUBSTR TMB**
30 min incubation (room temperature, protected from light)

 aspiration
4. imaging of wells and image analysis scanner Seramun *SpotSight*[®] plate / Seramun *SpotSight*[®] strip and software Seramun *SpotSight*[®] scan

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	LOT Batch code	REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.