

# Seraline<sup>®</sup> HepAk-7 IgG

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

REF LIA-004-7 G  20  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · [www.seramun.com](http://www.seramun.com)  
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com)

## Einführung

Bei den autoimmunen Lebererkrankungen unterscheidet man zwischen Autoimmunhepatitis (AIH) Typ I bis III, 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 Seraline<sup>®</sup> HepAk-7 IgG ermöglicht einen schnellen und zuverlässigen Nachweis von wichtigen Autoantikörpern zur Diagnose und Differentialdiagnose autoimmuner Lebererkrankungen.

Autoantigen	Klinische Relevanz / Spezifität	Beschreibung
AMA/M2	PBC (95%)	Antigene in der Mitochondrienmembran, hauptsächlich das M2 Protein des Pyruvatdehydrogenasekomplexes AMA/M2
LKM1	AIH II (95 - 100%)	Epitope des Cytochrom p450 Proteins
LC1	AIH II (50%)	zytosolisches 62 kDa Antigen
SLA	AIH III	50 kDa lösliches Leberantigen
F-Aktin	AIH I wenig spezifisch	polymerisierte Filamente des Aktins
gp210	PBC (10 - 25%) hochspezifisch	Membranprotein des Zellkern-Poren-Komplexes
Sp100	PBC (30%)	Protein der "nukleären Dots" in der Immunfluoreszenz

#### Literatur:

1. Klein, R., Berg, P., Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz. *Klin.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 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

## Anwendungsbereich

Der *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von Autoantikörpern vom IgG Isotyp gegen folgende Antigene: AMA/M2, LKM1, LC1, SLA, F-Aktin, gp210 und Sp100 in humanem Serum oder Plasma.

## Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

### Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1 : 101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

### Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (anti-human-IgG, oder -IgA oder -IgM) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

### Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*<sup>®</sup>scan automatisch ausgewertet werden.

## Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2..8°C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20°C zu lagern. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

## Testkomponenten

1	<b>TESTSTR</b>	<b>Teststreifen inkl. Auswerteschablone</b>	<b>20 Streifen</b> Farbcodierung: grün
2	<b>WIB CONC 5x</b>	<b>Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach</b>	<b>70 ml</b> Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	<b>CONJ HRP IgG</b>	<b>Anti-human IgG-POD- Konjugat</b>	<b>35 ml</b> gebrauchsfertig, <b>IgG</b> , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe
4	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrat</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	<b>35 ml</b> gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	<b>INCUTRAY</b>	<b>Inkubationswanne mit Deckel</b>	<b>2</b>

## Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

## Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

### Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 Bestimmungen durchgeführt werden.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

### Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

## Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

## Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

### Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

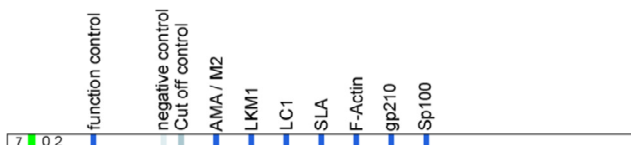
## Auswertung

### Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG sind untereinander 3 Kontrollbanden aufgetragen:

- a) Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- b) Die Intensität der negativ-Kontrolle muss kleiner als die der Cut-off-Kontrolle sein.
- c) Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Banden als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



## Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*<sup>®</sup>scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Banden mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG
negativ	Farbintensität der Banden < Cut-off-Kontrolle
positiv	Farbintensität der Banden $\geq$ Cut-off-Kontrolle

## Leistungsmerkmale

### Sensitivität

Zur Einschätzung der Leistungsmerkmale wurden 73 klinisch definierte Seren von Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen mit dem *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG und anderen kommerziellen Testen vergleichsweise untersucht. Die Ergebnisse sind nach den betreffenden Antigenen gelistet in den nachfolgenden Vierfeldertafeln dargestellt.

#### AMA/M2

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	39	5
	negativ	6	23

Übereinstimmung: 85%

#### LKM1

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	3	0
	negativ	3	67

Übereinstimmung: 96%

#### LC1

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	6	0
	negativ	0	67

Übereinstimmung: 100%

#### SLA

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	8	1
	negativ	1	63

Übereinstimmung: 97%

#### F-Aktin

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	4	4
	negativ	2	63

Übereinstimmung: 92%

gp210

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	16	0
	negativ	2	55

Übereinstimmung: 97%

SP100

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positiv	negativ
Vergleichs- test	positiv	6	0
	negativ	0	67

Übereinstimmung: 93%

Die Untersuchung eines Kollektivs aus 341 Proben von Patienten mit PBC im *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG ergab für die Antigene AMA/M2, Sp100 und gp210 insgesamt eine Sensitivität von 81%. Parallel durchgeführte Untersuchungen dieses Kollektivs mit 3 Testen anderer Hersteller ergaben Sensitivitäten von 71%, 81% und 70%.

### Spezifität

Die Untersuchung von 120 Seren von Blutspendern und 40 Seren von Patienten mit einer Virushepatitis (HBV, HCV) ergab eine Spezifität von 92%. Von den 40 Hepatitis positiven Seren waren 38 im *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG negativ. Bei jeweils einem Patienten wurden Antikörper gegen LKM1 bzw. F-Aktin detektiert.

### Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen. Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

### Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

## 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. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** 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
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung



Hersteller



Bestell-Nummer



Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur






Arbeitsanleitung beachten



# Seraline<sup>®</sup> HepAk-7 IgG

Line Immunoassay for detection of IgG-autoantibodies in autoimmune liver diseases  
in human serum or plasma

REF LIA-004-7 G  20  *In-vitro*-Diagnostic device 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · [www.seramun.com](http://www.seramun.com)  
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com)

## Introduction

Primary autoimmune liver disease (PAL) can be subdivided into autoimmune hepatitis (AIH) type I to III, 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 *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG test enables the fast determination of autoantibodies with diagnostic relevance for autoimmune liver diseases.

Autoantigen	Clinical relevance / specificity	Description
AMA/M2	PBC (95%)	antigens in the mitochondrial membrane, mainly the M2 protein of the pyruvatdehydrogenase complex. AMA/M2
LKM1	AIH II (95 - 100%)	epitopes of the Cytochrome p450 protein.
LC1	AIH II (50%)	Cytosolic 62 kDa antigen
SLA	AIH III	50 kDa soluble liver antigen
F-Aktin	AIH I less specific	polymerized filaments of the Actin protein.
gp210	PBC (10 - 25%) Highly specific	membrane protein of nuclear pore complex
Sp100	PBC (30%)	Protein of "nuclear dots"

#### Literature:

1. Klein, R., Berg, P., Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz. *Klin.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 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

## Intended use

The *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG is a Line Immunoassay (LIA) for detection of autoantibodies of the IgG isotype directed against the following antigens: AMA/M2, LKM1, LC1, SLA, F-Actin, gp210 and Sp100 in human serum or plasma samples.

## Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

### Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

### Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

### Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates. The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*<sup>®</sup>scan software.

## Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

## Kit components

1	<b>TESTSTR</b>	<b>test strips incl. evaluation template</b>	<b>20 strips</b> colour coded: green
2	<b>WIB CONC 5x</b>	<b>wash and incubation buffer 5-fold</b>	<b>70 ml</b> concentrate, transparent bottle, black cap
3	<b>CONJ HRP IgG</b>	<b>anti-human IgG-HRP-conjugate</b>	<b>35 ml</b> , ready to use, <b>IgG</b> , coloured red, transparent bottle, red cap
4	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>substrate</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	<b>35 ml</b> , ready to use, black bottle, blue cap
5	<b>INCUTRAY</b>	<b>incubation tray with cover</b>	<b>2</b>

## Materials required but not provided

- glassware
- pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl
- plastic forceps
- rocking platform (vertical)
- filter paper
- collecting devices for infectious material
- distilled or deionized water

## Preparation and storage of reagents

### Kit size and expiry

One kit is designed for 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

### Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

## Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

## Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

### Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

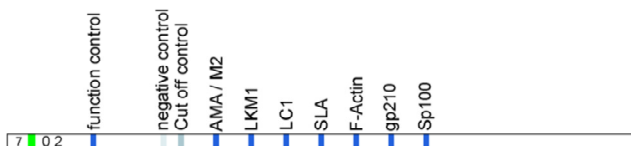
## Test evaluation

### Test validity

The *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG test strips contain 3 consecutive control lines under the test strip number:

- a) Function control (positive reaction with every sample).
- b) The intensity of the negative control must be less than the Cut off control.
- c) Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control and the Cut off control are clearly visible.



## Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*<sup>®</sup> scan software. Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG
negative	Colour intensity of bands < Cut off control
positive	Colour intensity of bands ≥ Cut off control

## Performance characteristics

### Sensitivity

73 Sera from patients with clinically defined autoimmune liver diseases have been tested with the *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG and other commercially available tests. The results for the different antigens are shown in the following tables.

#### AMA/M2

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG		Agreement: 85%
		positive	negative	
competitor	positive	39	5	
	negative	6	23	

#### LKM1

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG		Agreement: 96%
		positive	negative	
competitor	positive	3	0	
	negative	3	67	

#### LC1

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG		Agreement: 100%
		positive	negative	
competitor	positive	6	0	
	negative	0	67	

#### SLA

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG		Agreement: 97%
		positive	negative	
competitor	positive	8	1	
	negative	1	63	

#### F-Aktin

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG		Agreement: 92%
		positive	negative	
competitor	positive	4	4	
	negative	2	63	

gp210

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positive	negative
competitor	positiv	16	0
	negativ	2	55

Agreement: 97%

SP100

		<i>Seraline</i> <sup>®</sup> HepAk-7 IgG	
		positive	negative
competitor	positiv	6	0
	negativ	0	67

Agreement: 93%

Serum samples from 341 patients with PBC were tested for AMA/M2, Sp100 and gp210 antigens in comparison with 3 different competitor test kits. The estimated sensitivity was 81 % for the *Seraline*<sup>®</sup> HepAk-7 IgG versus 71 %, 81 % and 70 % for the competitor kits.

### Specificity

The screening of 120 serum samples from blood donors and additional 40 serum samples of patients with virus induced hepatitis (HBV, HCV) resulted in an estimated specificity of 92%. In only two serum samples LKM1 and F-Actin specific antibodies were detected, respectively.

### 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. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

### Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

## Common advices and precautions

**This kit is for *in-vitro* use only.** Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

**Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.**

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.

Since the kit contains potentially hazardous materials, 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
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use