




SeraSpot[®] HepAk-7 IgG

Spotimmunoassay zum quantitativen Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen 7 Antigene bei autoimmunen Lebererkrankungen in Serum oder Plasma humanen Ursprungs

REF	SP-004-7 G-S6		48
REF	SP-004-7 G-S12		96
REF	SP-004-7 G-S24		2 x 96
IVD	In-vitro-Diagnostikum		CE




Seramun Diagnostica GmbH • Spreehagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

UDI Eindeutige Produktidentifizierung


IVD In-vitro Diagnostikum

 Hersteller

 Land der Herstellung und Datum der Herstellung

 Nicht wiederverwenden

SN Seriennummer

 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit

 Vor Sonnenlicht schützen

REF Artikelnummer

 Gebrauchsanweisung beachten


 Verwendbar bis

LOT Chargennummer

 Ausreichend für *n* Prüfungen

 Biologisches Risiko

 Temperaturbereich

 Achtung

Zweckbestimmung

SeraSpot® HepAk-7 IgG ist ein IVD-Test zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern des IgG-Isotyps gegen die Antigene AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, F-Aktin, gp210 und Sp100 in Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Der Test wird angewendet in Kombination mit dem Gerät Seramun SpotSight® plate mono / Seramun SpotSight® strip zur Bildaufnahme und der Software Seramun SpotSight® scan zur Bildanalyse.

Er dient der Diagnosehilfe von autoimmunen Lebererkrankungen in Proben von Patienten mit Verdacht auf eine autoimmune Lebererkrankung.

Der Test darf nicht verwendet werden mit anderen Probenmaterialien als Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs, zu Diagnose, Überwachung, Screening, Vorhersage, Prognose als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung und durch Laienanwender.

Testprinzip

SeraSpot® HepAk-7 IgG Test ist ein Festphasenimmunoassay (Spotimmunoassay) basierend auf der Verwendung rekombinanter oder nativer, gereinigter Antigene, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96-well Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Autoantikörper gegen AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, F-Aktin, gp210 und Sp100 dienen. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch Waschschriffe entfernt und spezifisch gebundene Antikörper mittels Peroxidase (HRP)-markierten anti-human IgG-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausbilden, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitation des Substrats. 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 min in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Kavitäten mit verdünntem Waschpuffer.

Schritt 2

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

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 min mit Substrat SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen des Substrates. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die entwickelten Arrays sind bis zur Bildanalyse lichtgeschützt aufzubewahren.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2 x 96 Bestimmungen	
1	WELLS	Mikrotiterplatte (Kavitäten mit Arrays) spezifische Antigene und Kontrollen als Spots in Arrayformat immobilisiert	6 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung grün vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung grün vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2 x 12 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung grün vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe	2 x 100 mL Konzentrat für je 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent B	55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe	2 x 55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe	4 x 55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG	Konjugat anti-Human IgG-HRP Konjugat (Schaf)	8,0 mL gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe	8,0 mL gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe	2 x 8,0 mL gebrauchsfertig rot gefärbt rote Kappe
5	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe	8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe	2 x 8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2 Stück	2 Stück	4 Stück
7	SWAB	Tupfer 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3 x 2 Stück	6 x 2 Stück	12 x 2 Stück
8		Analysenzertifikat	1 Stück	1 Stück	1 Stück
9		Gebrauchsanleitung	1 Stück	1 Stück	1 Stück

Verwendete Antigene

Bezeichnung	Beschreibung	Klinische Relevanz
AMA-M2	M2-Protein des mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase(PDH)-Komplexes	primäre biliäre Cholangitis (PBC)
LKM1	mikrosomales Leber-Nieren Antigen Typ 1, Cytochrom P450 2D6 (LKM 1 hp)	Autoimmunhepatitis Typ II (AIH II)
LC1	cytosolisches Leberantigen Typ 1, Formiminotransferase Cyclodeaminase (62 kDa)	Autoimmunhepatitis Typ II (AIH II)
SLA	lösliches Leberantigen, 50 kDa UGA-Suppressor Serin-tRNA assoziiertes Protein	Autoimmunhepatitis Typ III/I (AIH III/I)
F-Aktin	Polymerisierte Filamente des Aktin-Proteins	Autoimmunhepatitis Typ I (AIH I), weniger spezifisch
gp210	210 kDa Glykoprotein des Kernporenkomplexes	primäre biliäre Cholangitis (PBC), hoch spezifisch
Sp100	„Speckled pattern 100“, auch Proteine der Kernpunkte	primäre biliäre Cholangitis (PBC)

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • Verstellbare 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten • Reagenzienbehälter für Mehrkanal-Mikropipetten • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung • Teströhrchenständer • Mikrotiterplatten-Waschgerät • Laborsystem Seramun SpotSight® plate mono / strip Scanner mit angeschlossenenem PC (Auswertesoftware Seramun SpotSight® scan) • deionisiertes Wasser • fusselfreies Filterpapier • Stoppuhr • Auffanggefäße für infektiöse und nicht-infektiöse Lösungen • lichtundurchlässige Abdeckung (Substrat-Reaktion)

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Probenpuffer, Waschpuffer und Substrat erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit SeraSpot® HepAk-7 IgG auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Testkomponenten bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen!

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden. Reagenzien mit Anzeichen einer Kontamination sollten nicht verwendet werden.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Nicht korrekte Probenverdünnung, nicht korrektes 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.

Beschädigte Arrays durch **Kratzer** auf dem Boden der Kavitäten sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer 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.

Arbeitsplatzanforderungen

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

Sicherheitshinweise

Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

WELLS	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208 EUH210	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
DIL	EUH208 EUH210 -	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ HRP IgG	Gefahrbestimmende Komponente EUH208 H360D P202 P280 P308+P313 P501 -	N-Methyl-2-pyrrolidon; 1-Methyl-2-pyrrolidon Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Nur für gewerbliche Anwender. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Inhalt / Behälter gemäß den geltenden lokalen Vorschriften der Entsorgung zuführen. Enthält Material tierischen Ursprungs.
SWAB	Gefahrbestimmende Komponente H225 H319 H336 P210 P280 P304+P340 P305+P351+P338	2-Propanol; Isopropylalkohol; Isopropanol Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Verursacht schwere Augenreizung. Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz / Gehörschutz tragen. BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

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.

Kontaminationen der Reagenzien oder der Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

In seltenen Fällen können Proben Antikörper gegen BSA (Rinderserumalbumin) und / oder AGE (advanced glycation end products) enthalten, die unspezifische Reaktionen hervorrufen können, so dass das Testergebnis durch die Software Seramun SpotSight® scan als „nicht auswertbar“ („n.a.“) bewertet wird.

Behandlung der Proben

Probennahme

Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs in geeignetem Gefäß sammeln.

Probenhaltbarkeit und -lagerung

Serum- oder Plasmaproben humanen Ursprungs maximal 7 Tage bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei < -15 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Vor der Verwendung die Proben auf Raumtemperatur erwärmen und durch kurzes Aufschütteln die Homogenität sichern.

Proben mit Probenpuffer 1 : 101 (v/v) in einem Teströhrchen (zusätzlich benötigtes Hilfsmittel) verdünnen.

Beispiel: 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Mikrotiterstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zu 1 Monat verwendbar.

Reagenzienvorbereitung

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

Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser. Der verdünnte Waschpuffer ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen!

Das **Substrat** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen. Sollte das Substrat dunkel gefärbt sein oder Partikel aufweisen, darf dieses nicht mehr verwendet werden.

Testdurchführung

Die Durchführung erfolgt bei Raumtemperatur (RT, 18...25 °C). **Alle** gebrauchsfertigen Testreagenzien, den verdünnten Waschpuffer und die Mikrotiterplatte **auf Raumtemperatur erwärmen**.

Alle Reagenzien vor Gebrauch durch leichtes Schütteln mischen, Schaumbildung vermeiden. Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Waschgerätes erfolgen.

Wichtige Hinweise zur Testdurchführung:

Mechanischer Kontakt (**Kratzen**) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Waschgerät-Nadeln ist zu **vermeiden**. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!

Alle Flüssigreagenzien (verdünnte Probe, Konjugat und Substrat) sind **blasenfrei** in die Kavitäten einzubringen!

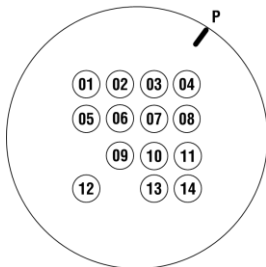
1. Benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** entsprechend der Probenanzahl bereitstellen.
2. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Probe: 1 : 101 Verdünnung
z.B. 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer **DIL**
3. **100 µL** verdünnte Probe pro Kavität pipettieren.
4. Kavitäten mit Abdeckfolie **COVER** abkleben und **30 min** bei RT inkubieren.
5. Lösung absaugen. Kavitäten **3x** mit jeweils **400 µL** verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
6. **50 µL** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** (anti-Human IgG-HRP) pro Kavität pipettieren.
7. Kavitäten mit Abdeckfolie **COVER** abkleben und **30 min** bei RT inkubieren.
8. Lösung absaugen. Kavitäten **3x** mit jeweils **400 µL** verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
9. **50 µL** des gebrauchsfertigen Substrats **SUBSTR** pro Kavität pipettieren.
10. Kavitäten abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
11. Substrat absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
12. Vor der Bildaufnahme die Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
13. **Bildaufnahme** der Kavitäten mit dem Laborsystem Seramun SpotSight® plate mono / strip und Bildanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan.

Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Plattenrahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Nach dem Absaugen des Substrats sind die entwickelten Spots bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 h stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Antigene

05	LKM1
06	AMA-M2
07	LC1
09	SLA
10	Sp100
12	F-Aktin
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

Quantitative Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

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

SeraSpot® HepAk-7 IgG 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 Färbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe in der Kavität befinden hat. Ein Ausbleiben 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 R1, immer angefärbt.
7. Referenz 3 (R3), entspricht 60 rel.Units. Schwächere Färbung als R2, immer angefärbt.

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

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung des Laborsystems Seramun SpotSight® plate mono / strip in Kombination mit der Software Seramun SpotSight® scan.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	Bedingungen
Positiv	Farbintensität eines oder mehrerer Antigen-Spots* > Cut-off Kontrolle
Negativ	Farbintensität der Antigen-Spots ≤ Cut-off Kontrolle

*Bei der Beurteilung des Testergebnisses ist zu beachten, dass nach S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen (2017) für den Nachweis von Anti-F-Aktin-Autoantikörpern vom IgG-Typ die Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenz empfohlen wird (5).

Leistungsmerkmale

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im SeraSpot® HepAk-7 IgG untersucht und die 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 (Lot-zu-Lot-VK) ermittelt.

Antigen	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient		Lot-zu-Lot-Variationskoeffizient	
	\bar{x} rel.Units n=40	VK [%]	\bar{x} rel.Units n=80	VK [%]	\bar{x} rel.Units n=240	VK [%]
AMA-M2	36,8	6,8	38,9	14,9	42,2	16,3
LKM1	58,2	5,3	84,8	12,3	86,2	12,6
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
F-Aktin	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
Sp100	88,6	6,2	84,7	11,4	92,4	18,7
Durchführung	1 Bearbeiter 40 x Bestimmungen 1 Charge		5 Bearbeiter 2 x Bestimmungen 2 x Durchführung pro Tag 20 Tage 1 Charge		5 Bearbeiter 2x Bestimmungen 2x Durchführung pro Tag 20 Tage 3 Chargen	

Festlegung der Grenzwerte

Die Daten aus den Studien zur Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung im Vergleich zu Referenztests wurden mittels ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics) zur Bestimmung des Wertes für die Cut-off Kontrolle verwendet.

Der Cut-off Bereich wird testspezifisch festgelegt.

Interferierende Substanzen

Alle getesteten Substanzen haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Testergebnisse, wenn sie in stark erhöhten Konzentrationen im Serum vorhanden sind: Bilirubin C und F (Simulation ikterischer Proben) je 20 mg/dL; Hämoglobin (Simulation hämolytischer Proben) 500 mg/dL, Lipide (Triglyceride) (Simulation lipämischer Proben) 1000 mg/dL und Rheumafaktor 500 IU/mL.

Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden vorcharakterisierte Proben im Vergleich zu IgG Referenztesten im SeraSpot® HepAk-7 IgG untersucht. Proben mit diskrepanten Ergebnissen wurden in einem zweiten Referenztest nachgetestet.

AMA-M2		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	29	0
	negativ	0	0
Proben gesamt		29	0

Sensitivität: 100 %

LKM1		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	8	0
	negativ	0	0
Proben gesamt		8	0

Sensitivität: 100 %

LC1		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	7	0
	negativ	0	0
Proben gesamt		7	0
Sensitivität:		100 %	

SLA		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	7	0
	negativ	0	0
Proben gesamt		7	0
Sensitivität:		100 %	

F-Aktin		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	12	0
	negativ	1	0
Proben gesamt		13	0
Sensitivität:		92,3 %	

gp210		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	19	0
	negativ	0	0
Proben gesamt		19	0
Sensitivität:		100 %	

Sp100		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	18	0
	negativ	0	0
Proben gesamt		18	0
Sensitivität:		100 %	

Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität wurden negative Blutspenderproben im Vergleich zu IgG Referenztesten im SeraSpot® HepAk-7 IgG untersucht. Proben mit diskrepanten Ergebnissen wurden in einem zweiten Referenztest nachgetestet.

AMA-M2		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	1
	negativ	0	191
Proben gesamt		0	192
Spezifität:		99,5 %	

LKM1		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	1
	negativ	0	191
Proben gesamt		0	192
Spezifität:		99,5 %	

LC1		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	1	2
	negativ	0	189
Proben gesamt		1	191
Spezifität:		99,0 %	

SLA		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	0
	negativ	0	192
Proben gesamt		0	192
Spezifität:		100 %	

F-Aktin		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	0
	negativ	0	182
Proben gesamt		0	182
Spezifität:		100 %	

gp210		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	1
	negativ	0	190
Proben gesamt		0	191
Spezifität:		99,5 %	

Sp100		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	0
	negativ	0	191
Proben gesamt		0	191
Spezifität:		100 %	

Kreuzreaktivität

Potenziell kreuzreaktive Proben wurden im SeraSpot® HepAk-7 IgG getestet und mit einem Referenztest nachuntersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay nachgetestet, wobei die im Referenztest 2 erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung, der im SeraSpot®-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen.

Hepatitis-B-Virus (HBV)- positive Proben (n=27)

HBV		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	0
	negativ	0	27
Proben gesamt		0	27
Spezifität:		100 %	

Hepatitis-C-Virus (HCV)- positive Proben (n=43)

HCV		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	0	0
	negativ	0	43
Proben gesamt		0	43

Spezifität: 100 %

Applikation

Automatische Abarbeitung




Die vergleichenden Untersuchungen per Hand verdünnter positiver Proben (n=96) zwischen manueller und automatischer Abarbeitung zeigen, dass die Abarbeitung des SeraSpot® HepAk-7 IgG am Mikrotiterplatten-Prozessor möglich ist. Daten wurden mit dem Gerät DS2® (Dynex Technologies) erhoben. Für die erstellte Regressionsgerade wurde ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,9$ für die Antigene (AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, gp210 und Sp100) erreicht. R^2 wurde nicht ermittelt, wenn mehr als 90 % der untersuchten Proben keine Antikörperreaktivität gegen die jeweiligen Antigene zeigten.

Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-10_v01_DE_EN	Gesamtes Dokument	Anpassung an neue GAL-Vorlage Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen der Sicherheitshinweise Wegfall Pipettierschema
	Wichtige Hinweise	Einfügen eines Hinweises zum Umgang mit schwerwiegenden Vorkommnissen
	Gesamtes Dokument	Aktualisierung von Formulierungen und Korrektur von Schreibfehlern

SeraSpot[®] HepAk-7 IgG

Spot immunoassay for the quantitative detection of IgG autoantibodies against 7 antigens of autoimmune liver diseases in serum or plasma of human origin

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



Seramun Diagnostica GmbH • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com



In-vitro diagnostic medical device



Unique device identifier



Manufacturer



Country of manufacture and date of manufacture



Article number



Serial number



Keep away from sunlight



Humidity limitation



Batch code



Consult instructions for use



Temperature limit



Do not reuse



Sufficient for n tests



Biohazard



Use-by date



Attention

Intended Use

SeraSpot® HepAk-7 IgG is an IVD test for the quantitative determination of autoantibodies of the IgG isotype against the antigens AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, F-Actin, gp210 and Sp100 in serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin by a laboratory professional user.

The test is used in combination with the Seramun SpotSight® plate mono / Seramun SpotSight® strip device for image acquisition and the software Seramun SpotSight® scan for image analysis.

It is intended to aid in the diagnosis of autoimmune liver disease in specimen materials from patients with suspicion of autoimmune liver disease.

The test must not be used with specimen materials other than serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin, for diagnosis, monitoring, screening, prediction, prognosis, as companion diagnostic, in the near-patient setting and by lay persons.

Principle of the Test

SeraSpot® HepAk-7 IgG is a solid phase immunoassay (spot immunoassay) using recombinant or native purified antigens printed in array format (spot array) on the bottom of wells of 96-well microtiter plates. Antibodies will bind to the immobilized antigens AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, F-Actin, gp210 and Sp100. After incubation and wash steps bound antibodies are detected by horseradish peroxidase (HRP)-labelled antibodies against human antibodies of IgG-type by substrate reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide. Blue spots indicate the formation of immune complexes. Spots range from pale to dark blue and are visible by eye.

Detection of Specific Antibodies is Performed in 3 Steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 min at room temperature in selected wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with diluted wash buffer.

Step 2

Incubation of wells with the HRP-labeled anti-human IgG for 30 min at room temperature. Removal of unbound conjugate antibodies by aspiration and 3 wash cycles with diluted wash buffer.

Step 3

Incubation of wells with substrate SeramunBlau® spot dark for 30 min at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate, followed by tapping the plate / strip dry onto lint-free absorbent paper. The developed arrays are to be stored light-protected until image analysis.

Test Components (Delivery Scope)

			For 48 determinations	For 96 determinations	For 2 x 96 determinations
1	WELLS	Microtiter plate (wells with arrays) specific antigens and controls immobilized as spots in array layout	6 single breakable 8-well strips in frame color coding: green vacuum sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame color coding: green vacuum sealed with desiccant	2 x 12 single breakable 8-well strips in frame color coding: green vacuum sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL buffer colorless white cap	100 mL concentrate for 1000 mL buffer colorless white cap	2 x 100 mL concentrate for each 1000 mL buffer colorless white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 mL ready-to-use solution colored red black cap	2 x 55 mL ready-to-use solution colored red black cap	4 x 55 mL ready-to-use solution colored red black cap
4	CONJ HRP IgG	Conjugate anti-Human IgG-HRP conjugate (sheep)	8.0 mL ready-to-use solution colored red red cap	8.0 mL ready-to-use solution colored red red cap	2 x 8.0 mL ready-to-use solution colored red red cap
5	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap	8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap	2 x 8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap
6	COVER	Covering film	2 pieces	2 pieces	4 pieces
7	SWAB	Swab 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3 x 2 pieces	6 x 2 pieces	12 x 2 pieces
8		Certificate of Analysis	1 piece	1 piece	1 piece
9		Instructions for Use	1 piece	1 piece	1 piece

Antigens Used

Name	Description	Clinical relevance
AMA-M2	M2-protein of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase (PDH)-complex	primary biliary cholangitis (PBC)
LKM1	Liver-kidney microsomal antigen type 1, cytochrom P450 2D6 (LKM 1 hp)	Autoimmune Hepatitis type II (AIH II)
LC1	Liver cytosol antigen type 1, formiminotransferase cyclodeaminase (62 kDa)	Autoimmune Hepatitis type II (AIH II)
SLA	Soluble liver antigen, 50 kDa UGA-Suppressor Serin-tRNA associated Protein	Autoimmune Hepatitis type III/I (AIH III/I)
F-Actin	Polymerized filaments of the Actin Protein	Autoimmunhepatitis Typ I (AIH I), less specific
gp210	210 kDa glycoprotein of nuclear pore complex	primary biliary cholangitis (PBC), high specific
Sp100	„Speckled pattern 100“, protein of „nuclear dots“	primary biliary cholangitis (PBC)

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micro-pipettes • adjustable 8-channel micro-pipette or multi-pipette • reagent container for multi-channel micro-pipettes • measuring cylinder • test tubes for sample dilution • test tube rack • washer for 96-well microtiter plates • laboratory system: Seramun SpotSight® plate mono / strip scanner with evaluation software Seramun SpotSight® scan • deionized water • lint-free absorbent paper • stop watch • collecting devices for infectious material • opaque cover (substrate reaction)

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. The kit may be performed by laboratory professional user only.

Follow the instructions carefully. The shelf life specified must be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Do not use reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for sample diluent, wash buffer and substrate.

All serious incidents occurring in relation with SeraSpot® HepAk-7 IgG must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which the user and/or the patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all components to room temperature before use.

For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multi-channel pipette is recommended to avoid time delays. Reagents that appear contaminated should not be used.

Avoid time delays when dispensing reagents.

Substrate must be protected from direct light!

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of wells and incorrect timing may lead to erroneous results.

Air bubbles generated by forceful pipetting of samples and/or reagents may cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be evaluated.

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

Before taking images of the wells make sure to remove particles or fibers which may adhere to the bottom side of the wells using the swab provided in the kit.

Images of dried spots may appear more intense, which can lead to slight deviations of the measured values when scanned repeatedly. Assessment of the individual parameters is not changed.

Workplace Requirements

Processing spot immunoassays requires a clean workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells should be avoided. Fibers may cause interferences when taking images of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Some reagents may contain biocides as preservative. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

WELLS	-	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208 EUH210	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request.
DIL	EUH208 EUH210 -	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request. Contains material of animal origin.
CONJ HRP IgG	Hazard components EUH208 H360D P202 P280 P308+P313 P501 -	N-methyl-2-pyrrolidone; 1-methyl-2-pyrrolidone Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Restricted to professional users. May damage the unborn child. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection. IF exposed or concerned: Get medical advice / attention. Dispose of contents / container in accordance with local regulations. Contains material of animal origin.
SWAB	Hazard components H225 H319 H336 P210 P280 P304+P340 P305+P351+P338	Propan-2-ol; isopropyl alcohol; isopropanol Highly flammable liquid and vapour. Causes serious eye irritation. May cause drowsiness or dizziness. Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection. IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Limitations of the Procedure

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

In rare cases, specimens may contain antibodies to BSA (bovine serum albumin) and / or AGE (advanced glycation end products), which may cause nonspecific reactions, so that the test result is read as "not available" ("n.a.") by the Seramun SpotSight® scan software.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 7 days. For longer periods samples have to be stored at < -15 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Sample Preparation

Bring samples to room temperature before use. Homogeneity should be ensured by shaking components briefly.

Samples have to be diluted 1 : 101 (v/v) with sample diluent.

Example: 10 µL sample and 1000 µL sample diluent.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtitration strips is stable until the printed expiration date when stored at 2...8 °C. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

Reagent Preparation

Allow all components to reach **room temperature** prior to use. The **microtiter plate** is vacuum sealed 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 at 2...8 °C and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Dilute **wash buffer (10x)** 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water. The prepared wash buffer must be thoroughly mixed before use.

The **substrate** must be protected from direct light. The test should not be performed with a substrate solution that is colored dark or contains colored precipitates.

Assay Procedure

Performance at room temperature (RT, 18...25 °C). Bring **all** ready-to-use test reagents, prepared wash buffer and microplate to **room temperature**. Mix all reagents before use by gently shaking, avoid foaming.

The aspiration and washing steps can be carried out manually or with the aid of a microtiter plate washer.

Important Notes on Test Procedure:

Avoid mechanical contact (**scratching**) on the bottom of the wells with pipette tips or washer needles. This will irreparably damage the array!

All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted **without** causing **air bubbles** into the wells.

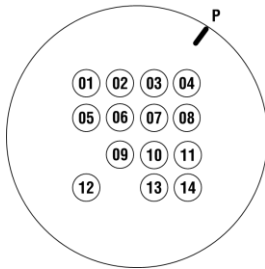
1. Provide the required number of wells **WELLS** according to the number of samples.
2. Preparation of working dilution of the sample: 1 : 101 dilution
e.g. 10 µL sample to 1000 µL sample diluent **DIL**
3. Pipette **100 µL** diluted sample per well.
4. Cover plate with covering film **COVER** and incubate for **30 min** at RT.
5. Remove liquid, then wash wells **3x** using **400 µL** diluted wash buffer per well,
Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
6. **Add 50 µL** of the conjugate **CONJ HRP IgG** (anti-Human IgG-HRP) to each well.
7. Cover plate with covering film **COVER** and incubate for **30 min** at RT.
8. Remove liquid, then wash wells **3x** using **400 µL** diluted wash buffer per well,
Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
9. **Add 50 µL** of the substrate **SUBSTR** to each well.
10. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at RT.
11. Remove liquid. Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
12. Clean bottom of wells with swab **SWAB** shortly before scanning the images.
13. **Take images** using the Seramun SpotSight® plate mono / strip und 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 scanner's strip holder.

After aspiration of the substrate the color of developed spots is stable for 24 h when the plate is stored protected from light.

Evaluation of Results

Arraylayout



Antigens

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

Quantitative evaluation

Validity Criteria for the Test

The spots NC, CO, R1 ... R3 are used to create a reference curve (4-parameter non-linear regression) to calculate the staining intensities of the antigen spots in relative units (rel.Units).

SeraSpot® HepAk-7 IgG includes the following control spots:

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

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

If the above mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the validity criteria contact the manufacturer.

Interpretation of Results

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun SpotSight® plate mono / strip and in combination with the Seramun SeraSpot® scan software.

The results are interpreted as follows:

Evaluation	Conditions
Positive	Color intensity of one or more antigen spots* > cut-off control
Negative	Color intensity of the antigen spots ≤ cut-off control

*When evaluating the result it should be noted that the S2k guideline on autoimmune liver diseases (2017) recommends the detection of anti-F-Actin autoantibodies of the IgG type by indirect immunofluorescence (5).

Performance Characteristics

Precision

Samples with known antibody reactivity were examined in the SeraSpot® HepAk-7 IgG and the rel.Units were determined. These values were then used to determine the coefficients of variation (CV) as a measure of the precision within a test run (intra-assay CV), between different test runs (inter-assay CV) and between different test lots (lot-to-lot CV).

Antigen	Intra-assay coefficient of variation		Inter-assay coefficient of variation		Lot-to-lot coefficient of variation	
	\bar{x} rel.Units n=40	CV [%]	\bar{x} rel.Units n=80	CV [%]	\bar{x} rel.Units n=240	CV [%]
AMA-M2	36.8	6.8	38.9	14.9	42.2	16.3
LKM1	58.2	5.3	84.8	12.3	86.2	12.6
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
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
Sp100	88.6	6.2	84.7	11.4	92.4	18.7
Procedure	1 operator 40 determinations 1 batch		5 operators 2 determinations 2 testings per day 20 days 1 batch		5 operators 2 determinations 2 testings per day 20 days 3 batches	

Determination of the Cut-off Value

Data from sensitivity and specificity studies compared to reference tests were used to determine the value for the cut-off control by ROC analysis (Receiver Operating Characteristics). The cut-off range is determined specifically for each test.

Interfering Substances

All tested substances do not have a significant impact on the test results even if present in elevated concentrations in the serum: 20 mg/dL bilirubin C and F each (simulation of icteric samples). 500 mg/dL hemoglobin (simulation of hemolytic samples). 1000 mg/dL lipids (triglycerides) (simulation of lipemic samples) and 500 IU/mL rheumatoid factor.

Sensitivity

Pre-characterized samples were analyzed to determine the sensitivity and specificity of SeraSpot® HepAk-7 IgG in comparison with IgG reference tests. Samples with discrepant results were retested in a second reference test.

AMA-M2		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	29	0
	negative	0	0
Samples total		29	0
Sensitivity:		100 %	

LKM1		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	8	0
	negative	0	0
Samples total		8	0
Sensitivity:		100 %	

LC1		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	7	0
	negative	0	0
Samples total		7	0
Sensitivity:		100 %	

SLA		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	7	0
	negative	0	0
Samples total		7	0
Sensitivity:		100 %	

F-Actin		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	12	0
	negative	1	0
Samples total		13	0
Sensitivity:		92.3 %	

gp210		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	19	0
	negative	0	0
Samples total		19	0
Sensitivity:		100 %	

Sp100		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	18	0
	negative	0	0
Samples total		18	0
Sensitivity:		100 %	

Specificity

Blood donor samples were examined for the specificity in comparison to reference tests in IgG detection of SeraSpot® HepAk-7 IgG. Samples with discrepant results were retested in a second reference test.

AMA-M2		Reference test	
		positive	positive
SeraSpot®	positive	0	1
	negative	0	191
Samples total		0	192
Specificity:		99.5 %	

LKM1		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	1
	negative	0	191
Samples total		0	192
Specificity:		99.5 %	

LC1		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	1	2
	negative	0	189
Samples total		1	191

Specificity: 99.0 %

SLA		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	0
	negative	0	192
Samples total		0	192

Specificity: 100 %

F-Actin		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	0
	negative	0	182
Samples total		0	182

Specificity: 100 %

gp210		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	1
	negative	0	190
Samples total		0	191

Specificity: 99.5 %

Sp100		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	0
	negative	0	191
Samples total		0	191

Specificity: 100 %

Cross Reactivity

Potential cross-reacting samples were tested in the SeraSpot® HepAk-7 IgG and re-tested in a reference test. Samples with discrepant results were re-tested in a second reference test. Results obtained with the second reference test were used for the final status determination of the discrepant samples.

Hepatitis-B-Virus (HBV)- positive samples (n=27)

HBV		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	0
	negative	0	27
Samples total		0	27

Specificity: 100 %

Hepatitis-C-Virus (HCV)- positive samples (n=43)

HCV		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	0	0
	negative	0	43
Samples total		0	43

Specificity: 100 %

Application

Automated Workflow

Manually diluted positive samples (n=96) were assayed side by side in SeraSpot® HepAk-7 IgG. by hand and by use of an automatic microplate processor. Data were generated with the device DS2® (Dynex Technologies). The correlation was calculated with $R^2 > 0.9$ for the antigens AMA-M2, LKM1, LC1, SLA, gp210 and Sp100. Assay procedure using an automatic microplate processor such as DS2® is possible. R^2 was not determined if more than 90 % of the samples tested showed no antibody reactivity for the respective antigens.

Change History

Version	Section	Modifications
2022-10_v01_DE_EN	Entire document	Use of new IFU template Updating of the intended use Conversion of the subsections Insertion of the safety instructions Removal of pipetting scheme
	Important Information	Insertion note on dealing with serious incidents
	Entire document	Updating of wording and correction of spelling mistakes

References

1. 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
2. Klein, R., Berg, P., Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz. Klein.Lab. 39, 1993: 611-626
3. 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
4. Rust, C., Beuers, U., Overlap syndromes among autoimmune liver diseases World J.Gastroenterol. 14 (21), 2008: 3368-3373
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