

## Produkt- und Gebrauchsinformation

# 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** · Spreehagener 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)

### Vertrieb

Virotech Diagnostics GmbH · Löwenplatz 5 · 65428 Rüsselsheim · Germany · [www.virotechdiagnostics.com](http://www.virotechdiagnostics.com)  
Telefon +49 (0) 6142 6909 0 · Fax +49 (0) 6142 6909 19 · [info@virotechdiagnostics.com](mailto:info@virotechdiagnostics.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 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>	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	20 Streifen Farbcodierung: grün
2	<b>WIB CONC 5x</b>	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	<b>CONJ HRP IgG</b>	Anti-human IgG-POD- Konjugat (Ziege)	35 ml gebrauchsfertig, <b>IgG</b> , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe
4	<b>SUBSTR TMB</b>	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	<b>INCUTRAY</b>	Inkubationswanne mit Deckel	2

## 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.

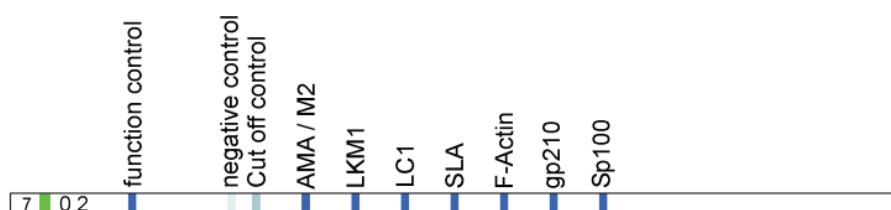
## Auswertung

### 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 (2, 3, 4) enthalten geringe Mengen Kathon (1,0% v/v) als Konservierungsmittel. 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!**



Hersteller

**REF**

Bestell-Nummer

**LOT**

Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum



Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten