



Gebrauchsanweisung

Gültig ab 27.09.2022

HepAK 7^{plus} Dot

REF 4099

Dot Immunoassay zur Bestimmung von IgG Antikörpern gegen M2, gp210, sp100, LKM1, LC1, SLA und F-Aktin in humanem Serum



GA Generic Assays GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Deutschland

Telefon: +49 33708 9286 0
Fax: +49 33708 4417 25

info@genericassays.com
www.genericassays.com



24 x 7



1 Zweckbestimmung

Der HepAK 7^{plus} Dot ist ein qualitativer Dot Immunoassay zur Bestimmung von IgG Antikörpern gegen M2, gp210, sp100, LKM1, LC1, SLA und F-Aktin in humanem Serum.

Der HepAK 7^{plus} Dot dient zur Unterstützung bei der Diagnose von autoimmunen Lebererkrankungen in Verbindung mit anderen klinischen und laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen.

Der Immunoassay ist für den manuellen professionellen *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt.

2 Diagnostische Bedeutung

Der Formenkreis der Primär autoimmunen Lebererkrankungen (PAL) umfasst die Autoimmune Hepatitis (AIH), die Primär Biliäre Zirrhose (PBC) und die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC). Die Klinik der PAL unterscheidet sich in den meisten Fällen nicht grundsätzlich von anderen chronischen Lebererkrankungen. Ca. 15% der Fälle mit chronischen Lebererkrankungen weisen eine autoimmune Pathogenese auf (1). Nach Ausschluss einer infektiösen Pathogenese, insbesondere von Virusinfektionen, wird für die Differentialdiagnose der PAL vor allem die Bestimmung von Autoantikörperspezifitäten herangezogen. Für die PBC gelten Antikörper gegen mitochondriale Antigene als pathognomonisch. Von den mindestens 9 beschriebenen Subtypen (M1-M9) weisen nur M2 Antikörper eine hohe Spezifität für die PBC auf. Weitere spezifische Antikörper bei PSC sind gegen sp100 und gp210 gerichtet.

Bei Patienten mit einer AIH können verschiedene Autoantikörperreaktivitäten bestimmt werden. An Hand der bekannten Autoantikörper wird eine Unterteilung in 3 Subgruppen diskutiert. Charakteristisch für AIH Typ I ist der Nachweis von antinuklearen

Antikörpern (ANA) und Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA). ASMA erkennen antigene Strukturen, die durch polymeres F-Aktin gebildet werden. Hingegen werden beim Typ II Antikörper gegen Leber- und Nierenmikrosome (LKM1 Antikörper) gefunden, deren Zielantigen spezielle Fusionspeptide des Cytochrom P450 2D6 sind. Ebenfalls spezifisch für den Typ II sind LC1 Antikörper, die das im Zytosol nachweisbare Leberenzym Formiminotransferase-Zyklodeaminase erkennen. Seren von Patienten mit AIH Typ III weisen lediglich Antikörper gegen lösliches Leberantigen (SLA Antikörper) auf. Die „International Hepatitis Group“ hat diesen Subtyp allerdings nur vorläufig als selbständiges Krankheitsbild akzeptiert.

3 Testprinzip

Der Dot Immunoassay ist ein häufig verwendetes immunologisches Verfahren zur Bestimmung spezifischer Antikörper gegen verschiedene Antigene. Die Teststreifen sind mit testspezifischen Antigenen beschichtet. Sind Antikörper in der Patientenprobe vorhanden, binden sie an die Antigene. Ein mit Alkalischer Phosphatase markierter Sekundärantikörper detektiert den so gebildeten Immunkomplex. Ein farbloses Substrat wird in ein farbiges, unlösliches Produkt umgewandelt. Die Signalintensität des präzipitierten Reaktionsprodukts ist proportional zur Antikörperaktivität in der Probe.

4 Testkomponenten

Komponente	Beschreibung
Teststreifen A Ag 24 24 Stück	24 Teststreifen (gebrauchsfertig), jeder Teststreifen ist mit gereinigten Antigenen beschichtet - M2 (E1, E2 und E3 Untereinheiten des Pyruvate Dehydrogenase Komplex, nativ) - gp210 (Glykoprotein 210 der Zellkernmembran; rek. human) - sp100 (Kerndotprotein, rek. human) - LKM1 (Cytochrom P450 2D6: Fusions-peptide AA 193-218, AA 261-287, AA 321-351, rek. human) - LC1 (Leberzytosol Antigen, Formiminotransferase-Cyklo-deaminase; rek. human) - SLA (nativ, Ratte) - F-Aktin (nativ, Kaninchen) sowie Positiv- und Negativkontrolle
Probenverdünner C DIL 1 x 40 mL, gelber Deckel	Gefärbte Lösung (gebrauchsfertig; enthält ProClin 300)
Waschpuffer B BUF WASH 10x 1 x 40 mL, blauer Deckel	Konzentrierte Lösung (10x; enthält ProClin 300)
Konjugat IgG D CONJ 1 x 40 mL, roter Deckel	Gefärbte Lösung mit polyklonalem anti-human IgG Antikörper, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (gebrauchsfertig; enthält ProClin 300)
Substrat E SUB	Substratlösung aus Brom-chlorindolylphosphat (BCIP) and Nitroblautetrazolium (NBT;

1 x 40 mL, schwarzer Deckel	gebrauchsfertig; enthält Natriumazid)
Inkubationswanne 3 Stück	Inkubationswanne für 8 Teststreifen
Interpretationsschablone 1 Stück	Interpretationsschablone zum Aufkleben prozessierter Teststreifen
Qualitätskontrollzertifikat 1 Stück	-
Gebrauchsanweisung 1 Stück	-

5 Zusätzlich benötigtes Material

- Übliche Laborausrüstung
- Präzisionspipetten (5 – 1000 µL) und Einwegpipettenspitzen
- Messzylinder (100 – 1000 mL)
- Horizontalschüttler
- Plastikpinzette
- Adsorbierendes Papier oder Papiertücher
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6 Lagerung und Haltbarkeit

Nach Erhalt müssen alle Testkomponenten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, vorzugsweise in der Originalverpackung des Kits. Bei sachgemäßer Lagerung in den Originalbehältern sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch und sachgemäßer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C sind alle Komponenten mindestens 2 Monate haltbar.

7 Allgemeine Hinweise

Dieses Produkt ist nur für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt. Die Gebrauchsanweisung ist vor Anwendung sorgfältig zu lesen. Sie gilt nur für das vorliegende Produkt mit der angegebenen Zusammensetzung. Die Gebrauchsanweisung muss strikt befolgt werden, um zuverlässige Testergebnisse zu gewährleisten. Abweichungen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Komponenten dürfen nicht durch Testreagenzien anderer Chargen oder anderer Hersteller ausgetauscht werden.

Kontaminationen der Reagenzien müssen durch Anwendung aseptischer Techniken bei der Entnahme von Aliquots aus den Fläschchen vermieden werden. Nach Gebrauch müssen die Reagenzienfläschchen wieder fest mit den zugehörigen Deckeln verschlossen werden.

Kreuzkontaminationen von Proben oder Reagenzien können zu widersprüchlichen Testergebnissen führen und müssen durch Anwendung konsistenter Pipettier Techniken vermieden werden.

Die Reagenzien dürfen während des gesamten Verfahrens sowie bei Lagerung keiner intensiven Lichtquelle ausgesetzt werden.

Unzureichendes Waschen führt zu schlechter Präzision und erhöhten Messwerten. Nach jedem Waschschrift ist die Restflüssigkeit vollständig zu entfernen.

8 Vorbereitung

8.1 Vorbereitung von Reagenzien

Alle Komponenten und die Mikrotiterplatte müssen vor Gebrauch für mindestens 30 min auf Raumtemperatur (RT: 18 °C bis 25 °C) gebracht werden. Flüssige Reagenzien müssen zur Homogenisierung gut durchmischt werden.

8.1.1 Teststreifen

Die Teststreifen befinden sich in einem Umschlag. Unbenutzte Teststreifen sollten immer gekühlt und vor Feuchtigkeit geschützt in einem Plastikbeutel gelagert werden.

8.1.2 Probenverdünner

Der Probenverdünner ist gebrauchsfertig.

8.1.3 Waschpuffer

Der konzentrierte Waschpuffer muss vor Anwendung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt werden (z. B. 100 mL + 900 mL). Eine ausreichende Menge Waschlösung ist bereit zu stellen. Die gebrauchsfertige Waschlösung kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu 30 Tage gelagert werden.

8.1.4 Konjugat

Das Konjugat ist gebrauchsfertig.

8.1.5 Substrat

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Eine starke Lichteinwirkung auf die Substratlösung sollte vermieden werden.

8.2 Vorbereitung der Proben

8.2.1 Probenmaterial

Die Verwendung frischer Serumproben aus venös entnommenem Blut wird empfohlen. Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Proben sollten nicht verwendet werden. Unlösliche Bestandteile sollten durch Zentrifugation aus der Probe entfernt werden. Die Proben dürfen nicht thermisch inaktiviert werden.

8.2.2 Probenlagerung

Proben können bis zu drei Tagen bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben erfordert -20 °C. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Zur Mehrfachverwendung sollten die Proben aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt werden.

9 Durchführung

9.1 Ablaufschema

Die Streifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette aufgenommen werden. Der gesamte Testlauf soll auf einem Horizontalschüttler durchgeführt werden. Die Inkubationswanne sollte nach jeder Zugabe von Flüssigkeiten kurz geschüttelt werden, um sicherzustellen, dass die Streifen vollständig eingetaucht sind und um eventuell unter den Streifen vorhandene Luftblasen zu entfernen. Die angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten und starke Zeitverschiebungen beim Pipettieren von Proben und Reagenzien vermieden werden.

Schritt	Beschreibung
1. Zugabe von Waschpuffer	Teststreifen mit der Reaktionsseite nach oben in die Inkubationswanne legen und 2,0 mL gebrauchsfertigen Waschpuffer pro Teststreifen zugeben. Sicherstellen, dass alle Streifen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind.
2. Inkubation	Inkubation der Teststreifen für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln
3. Zugabe von Probenverdünner	Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und den Rest der Flüssigkeit mit Filterpapier aufnehmen. Zugabe von 1,5 mL gebrauchsfertigen Probenverdünner pro Teststreifen zugeben. Sicherstellen, dass alle Streifen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind.

4. Zugabe der Proben	Zugabe von 10 µL unverdünnter Proben pro Teststreifen
5. Inkubation	Inkubation der Teststreifen für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln
6. Waschzyklus	Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten. 3 x 3 min mit jeweils 1,5 mL Waschlösung unter leichtem Schütteln waschen. Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und den Rest der Flüssigkeit mit Filterpapier aufnehmen.
7. Zugabe des Konjugats	Zugabe von je 1,5 mL gebrauchsfertiges Konjugat pro Teststreifen
8. Inkubation	Inkubation der Teststreifen für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln
9. Waschzyklus	Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten. 3 x 3 min mit jeweils 1,5 mL Waschlösung unter leichtem Schütteln waschen. Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und den Rest der Flüssigkeit mit Filterpapier aufnehmen.
10. Zugabe des Substrats	Zugabe von je 1,5 mL gebrauchsfertiges Substrat pro Kavität
11. Inkubation	Inkubation der Teststreifen für 10 – 12 min bei RT unter leichtem Schütteln
12. Waschzyklus	Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten. 1 x 3 min mit jeweils 1,5 mL Waschlösung zum Stoppen der Reaktion unter leichtem Schütteln waschen. Dekantieren oder Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und den Rest der Flüssigkeit mit Filterpapier aufnehmen.
13. Trocknen	Die Streifen aus der Wanne nehmen und etwa 30 min auf saugfähigem Papier trocknen.
14. Analyse	Die getrockneten Streifen zur Bewertung auf die Interpretationsschablone kleben.

9.2 Automation

Die automatische Prozessierung des Immunoassays erfolgt analog zur manuellen Anwendung und muss durch den Anwender validiert werden.

10 Auswertung

10.1 Metrologische Rückverfolgbarkeit

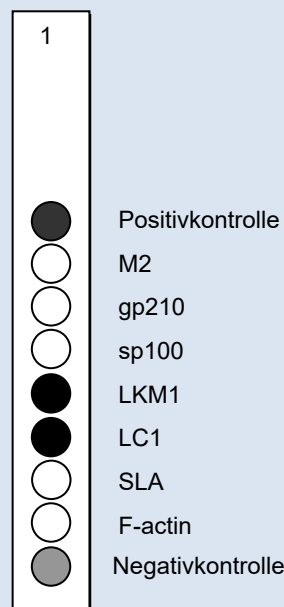
Der Immunoassay wurde an internen Referenzproben validiert.

10.2 Auswertung

Die qualitative Auswertung erfolgt durch Vergleich der antigenspezifischen Signalintensitäten der Patientenprobe mit der Signalintensität der Negativkontrolle auf dem Teststreifen. Die Negativkontrolle dient somit als cut off Kontrolle zur qualitativen Bewertung.

Die Teststreifen sind mit Antigenen beschichtet. Die Farbintensität ist proportional zur spezifischen Antikörperaktivität in der Probe. Eine Probe wird positiv evaluiert, wenn die Färbung des Antigendots eine intensivere Färbung aufweist als die Negativkontrolle auf dem Teststreifen. Eine Probe wird negativ evaluiert, wenn die Färbung des Antigendots eine schwächere oder gleiche Färbung aufweist wie die Negativkontrolle auf dem Teststreifen.

Beispiel eines prozessierten HepAK 7^{plus} Dot Teststreifens



10.3 Validitätskriterien

Ein Testlauf ist valide, wenn die nachfolgenden Validitätskriterien erfüllt sind:

- Intensität Negativkontrolle < Intensität Positivkontrolle
- Die Positivkontrolle muss positiv bewertet werden.

Die Färbung dieser Kontrollen bestätigt die korrekte Durchführung des Immunoassays. Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf nicht valide und muss wiederholt werden.

10.4 Problembehandlung

Im Falle eines invaliden Testlaufs sollten die Haltbarkeiten und Lagerungsbedingungen, die Inkubationszeiten und –temperaturen sowie die präzise Kalibrierung der Pipetten und aller anderen Geräte überprüft werden. Sollte sich kein Grund für den invaliden Testlauf finden, kontaktieren Sie bitte den Anbieter oder Hersteller des Produkts.

10.5 Referenzbereiche

Aufgrund der unterschiedlichen Seroprävalenzen in einzelnen Regionen sollte jedes Labor den Grenzwertbereich durch eigene Analysen verifizieren und ggf. anpassen.

10.6 Interpretation der Ergebnisse

Ein positives Ergebnis bestätigt die Anwesenheit spezifischer Antikörper. Ein negatives Ergebnis bestätigt die Abwesenheit spezifischer Antikörper, schließt jedoch eine Autoimmunreaktion nicht aus. Im Fall eines grenzwertigen Ergebnisses ist keine sichere Bewertung der Patientenprobe möglich.

10.7 Einschränkungen der Methode

Die Interpretation der Testergebnisse muss stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten erfolgen. Eine Diagnose sollte nicht allein auf den Ergebnissen einer individuellen diagnostischen Methode erfolgen, sondern immer unter Berücksichtigung aller klinischen und laboratoriumsmedizinischen Befunde erstellt werden. Zur Bestätigung sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

11 Leistungsmerkmale

11.1 Analytische Leistungsmerkmale

11.1.1 Präzision

Die Präzision der Messergebnisse wurde durch die Bestimmung der Intra- und Interassay Varianz durch Analyse mehrerer Proben mit unterschiedlichen Antikörperaktivitäten ermittelt. Dabei wurden keine Unterschiede in der qualitativen Bewertung der Proben beobachtet.

11.2 Diagnostische Leistungsmerkmale

11.2.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des Immunoassays wurden durch die Analyse von mehreren, mit Referenzmethoden vorbewerteten Proben bestimmt.

	Sensitivität	Spezifität
M2	94 %	94 %
gp210	> 99 %	> 99 %
sp100	> 99 %	> 99 %
LKM1	> 99 %	> 99 %
LC1	> 99 %	> 99 %
SLA	> 99 %	> 99 %
F-actin	97 %	98 %

12 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt ist ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik und nur für die Anwendung durch qualifiziertes, autorisiertes und geschultes Fachpersonal vorgesehen. Alle Testkomponenten und menschliche Proben sollten als potenziell gefährlich mit entsprechender Vorsicht behandelt werden. Gute Laborpraxis (GLP) und alle relevanten Vorschriften sollten eingehalten werden.

Sollte das Produkt beschädigt oder die Produktinformationen einschließlich der Etikettierung falsch oder fehlerhaft sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller oder den Lieferanten.

Das Produkt enthält Präparationen menschlichen und / oder tierischen Ursprungs. Obwohl alle Materialien aus humanen Körperflüssigkeiten oder Organen zur Herstellung von Komponenten negativ auf HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen), anti-HIV und anti-HCV Antikörper getestet wurden, müssen alle Komponenten und Patientenproben gemäß nationalen Gesetzen und anzuwendenden Richtlinien zur Biologischen Sicherheit als potenziell gefährlich eingestuft und entsprechend behandelt werden.

Da das Produkt potenziell gefährliche Materialien enthält, sollten die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden: Beim Umgang mit Kitmaterial oder Proben nicht rauchen, essen oder trinken. Direkten Kontakt mit Kitmaterial oder Proben durch das Tragen von Schutzhandschuhen, Laborkittel und Schutzbrille vermeiden. Niemals Material mit dem Mund pipettieren. Verschüttetes Material sofort aufnehmen und die betroffene Oberfläche gründlich mit einem Dekontaminationsmittel reinigen. Nach Gebrauch gründlich Hände waschen.

Einige Reagenzien enthalten ProClin (< 0,0015 %) als Konservierungsmittel und dürfen nicht verschluckt werden oder mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (< 0,1 %) als Konservierungsmittel und dürfen nicht verschluckt werden oder mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen. Der möglichen Bildung von Schwermetallaziden in der Drainage ist durch ausreichende Spülung mit Wasser vorzubeugen.

Die Angaben im Sicherheitsdatenblatt zu möglichen Gefahren, Erste-Hilfe-Maßnahmen, Maßnahmen bei unbeabsichtigter Freisetzung großer Mengen, Handhabung und Lagerung, persönliche Schutzausrüstung, Hinweise zur Entsorgung sowie Angaben zur Toxikologie sind zu beachten.

Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats zu melden, in dem der Benutzer und / oder der Patient ansässig sind.

13 Entsorgung

Zur Dekontamination und Entsorgung müssen die Empfehlungen der CDC sowie die jeweils geltenden lokalen und nationalen Richtlinien und gesetzlichen Vorschriften eingehalten werden. Proben, potentiell kontaminierte Materialien und infektiöse Abfälle müssen, z. B. durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C, dekontaminiert werden.

14 Referenzen

- Czaja AL. Natural history, clinical features and treatment of autoimmune hepatitis. Semin. Liver Dis. 1987, 4, 1 – 12.
- Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. World J. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. Gastroenterol. 2008, 14, 3374 – 87.
- Nakamura M et al. Specificity and Sensitivity of gp210 Autoantibodies detected using an Enzym-Linked Immunosorbent Assay and a Synthetic Polypeptide in the Diagnosis of Primary Biliary Cirrhosis. Hepatology 1996, 23, 1020 – 4.
- Corpechot C et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. Hepatology. 2008, 48, 871 – 7.

15 Symbole



Hersteller



CE-Konformitätskennzeichnung



In vitro Diagnostikum



Artikelnummer



Unique device identifier



Chargennummer



Begrenzung der Lagertemperatur



Verwendbar bis



Arbeitsanleitung beachten



Ausreichend für n Bestimmungen



Nicht wiederverwenden



Achtung



Biologisches Risiko



Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen



Teststreifen



Probenverdünner



Konjugat



Waschpuffer



Substrat

16 Änderungen

Änderungen in vorliegender Gebrauchsanweisung

Aktuelle Version	004/09.2022
Zusammenfassung der Änderungen	Redaktionelle Änderungen in allen Kapiteln