



Cisbio Bioassays
Parc Marcel Boiteux – BP 84175 – 30200 Codolet
/ France
Tel.: + 33 (0) 4 66 79 67 00
Fax: + 33 (0) 4 66 79 67 50
E-Mail: Cisbio_iva@PERKINELMER.com



www.cisbio.com/ivd-pi

REF

P3NP-ELISA

N-Terminal Procollagen III Peptide

Gebrauchsanweisung – DEU



Dokumentennummer: 10 – März 2023

1. BEZEICHNUNG UND VERWENDUNGSZWECK

Der P3NP-ELISA ist ein Immunoassay für die quantitative diagnostische in-vitro-Messung von N-terminalem Prokollagen-III-Peptid (PIIINP) in Serum, EDTA- oder Heparin-Plasma.

Das Kit ist für den professionellen Gebrauch in der in-vitro-Diagnostik vorgesehen.

2. EINFÜHRUNG

Prokollagen Typ III wird in Fibroblasten als biosynthetische Vorstufe des Kollagens Typ III synthetisiert und dann freigesetzt. Während der Umwandlung in Kollagen werden die Propeptide im Extrazellulärraum abgespalten. Bei diesem Prozess wird das N-terminale Propeptid (PIIINP; MG 45000) in äquimolaren Anteilen zu Kollagen Typ III gebildet und tritt in den Blutkreislauf ein.

Anhand der Spiegel von PIIINP im Blut lässt sich daher die Kollagen-III-Synthese messen.

2.1. Klinische Signifikanz der quantitativen Bestimmung von N-terminalem Prokollagen-III-Peptid

Die Kollagen-Haupttypen, die im Bindegewebe der Leber vorkommen, sind I und III. Wenn infolge von pathologischen Zuständen eine aktive Proliferation des Bindegewebes (Fibrose) in der Leber vorliegt, werden erhöhte Mengen an N-terminalem Prokollagen-III-Peptid gebildet.

Die Transformation von funktionsfähigem Lebergewebe in Bindegewebe ist anhand von erhöhten Konzentrationen an N-terminalem Prokollagen-III-Peptid im Blut nachweisbar. Dies ist etwa der Fall bei:

- **Alkohol- oder virusbedingten Formen von Leberfibrose und Zirrhose**
- **Nichtalkoholischer Steatohepatitis ((NASH) [1].**

Zudem empfiehlt die Europäische S3-Leitlinie zur systemischen Behandlung von *psoriasis vulgaris* PIIINP-Messungen im Rahmen von Laborkontrollen, um das Risiko einer Leberfibrose bei Patienten mit Psoriasis zu überwachen, die Methotrexat erhalten [2].

2.2. Pathologische Werte

Pathologische Zustände der Leber, die mit einer aktiven Proliferation des Bindegewebes assoziiert sind, führen zum Anstieg des PIIINP-Spiegels im Serum. Daher kann die Transformation von funktionsfähigem Lebergewebe in Bindegewebe durch die Messung von P3NP im Serum nachgewiesen werden. Je nach Schweregrad der Erkrankung kommt es bei chronisch aktiver Hepatitis, Leberfibrose und Leberzirrhose zu einem Anstieg von PIIINP im Serum.

Bei chronisch persistenter Hepatitis liegen die Werte generell im Normalbereich; Prokollagen-III-Peptid kann bei der Leberdegeneration erhöhte Konzentrationen aufweisen.

Auch bei der akuten Hepatitis ist der Prokollagen-III-Peptid-Spiegel im Serum erhöht.

Darüber hinaus gibt es jedoch auch andere Erkrankungen mit erhöhtem PIIINP-Spiegel ohne nachweisbare Veränderungen der Leber, z. B. Lungenfibrose [3], rheumatische Erkrankungen, Myokardinfarkt [4], Akromegalie, Polytrauma.

Die diagnostische Relevanz liegt in der Überwachung des Krankheitsverlaufs. Es besteht eine gute Korrelation mit histologischen Befunden bei Fibrose und Zirrhose.

3. TESTPRINZIP

Das P3NP-ELISA Kit ist ein **kolorimetrischer Sandwich-ELISA in einem Schritt**. Ein auf der Mikrotiterplatte immobilisierter monoklonaler Antikörper fängt die in den Kalibratoren und Proben enthaltenen PIIINP-Proteine. Die gebundenen Proteine werden dann von einem zweiten, an HRP (Meerrettichperoxidase) konjugierten monoklonalen Antikörper erkannt. Ungebundene Reagenzien werden durch Waschen entfernt. Hierauf wird die kolorimetrische Reaktion durch die Zugabe eines HRP-Substrats, TMP (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin), gestartet. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Säurelösung gestoppt und die optische Dichte (OD) der einzelnen Vertiefungen bei 450 nm gemessen. Die OD-Werte sind proportional zu den PIIINP-Proteinkonzentrationen in den Kalibratoren und Proben.

4. REAGENZIEN

Jedes Kit enthält ausreichend Reagenzien für 96 Tests. Das Verfalldatum ist auf dem äußeren Etikett des Testkits angegeben.

Vor dem Öffnen müssen alle Reagenzien bis zum Verfalldatum bei 2-8 °C gelagert werden.

Nach dem Öffnen kann das Kit für den Zeitraum von 6 Wochen verwendet werden, wenn die Reagenzien wie unten erläutert gelagert werden:

REAGENZIEN	SYMBOL	MENGE	LAGERUNG NACH DEM ÖFFNEN
MIKROTITERPLATE: Gebrauchsfertig. Monoklonaler Anti-PIIINP-Antikörper (Maus), immobilisiert auf der Oberfläche der Vertiefungen.	MICROPLATE	1 Platte (96 Vertiefungen) (Folienbeutel mit Trockenmittel)	Ungebrauchte Streifen können nach dem Öffnen 6 Wochen bei 2-8 °C ordnungsgemäß verschlossen im mitgelieferten Kunststoffbeutel mit dem Trockenmittel aufbewahrt werden.
KONJUGAT: Gebrauchsfertig. Gepufferte Lösung mit an Meerrettich-Peroxidase gebundenem monoklonalem Anti-PIIINP-Antikörper aus der Maus, Maus-Immunglobulinen, Stabilisatoren und Konservierungsstoff.	CONJ	1 x 12-mL-Vial	Nach dem Öffnen muss die Lösung bei 2-8 °C gelagert und innerhalb von 6 Wochen aufgebraucht werden.
VERDÜNNUNGSMITTEL – KALIBRATOR 0 (CAL 0): Gebrauchsfertig. Gepufferte Lösung mit Rinderproteinen, Konservierungsstoffen und einem orange-gelben Farbstoff.	DIL CAL0	1 x 35-mL-Vial	Nach dem Öffnen muss die Lösung bei 2-8 °C gelagert und innerhalb von 6 Wochen aufgebraucht werden.
KALIBRATOREN (CAL 1 – CAL 5): lyophilisiert. Lyophilisierte gepufferte Lösung mit fetalem Kälberserum, Rinderproteinen, Konservierungsstoffen und einem orange-gelben Farbstoff. 2,5 – 5 – 10 – 20 – 30 µg/L * Mit 1 mL destilliertem Wasser rekonstituieren, Verschlusskappe wieder aufsetzen, einige Male umdrehen und vortexen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen.	CAL	5 Vials qs 1 mL	Nach der Rekonstitution maximal 3 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahren. Bei 2-8 °C maximal 1 Woche lagern oder in aliquoten Teilen bei < -16 °C für 6 Wochen einfrieren (maximal 1 Mal Einfrieren).
KONTROLLEN 1 und 2 (Low und High): lyophilisiert. Lyophilisiertes Humanplasma +/- fetales Kälberserum Mit 0,25 mL destilliertem Wasser rekonstituieren, Verschlusskappe wieder aufsetzen, einige Male umdrehen und vortexen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. Die tatsächlichen Akzeptanzgrenzwerte der einzelnen Kalibratoren sind auf dem Etikett des Vials angegeben.	CONTROL	Je 1 Vial qs 0,25 mL	Nach der Rekonstitution maximal 3 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahren. Bei 2-8 °C maximal 1 Woche lagern oder in aliquoten Teilen bei < -16 °C für 6 Wochen einfrieren (maximal 1 Mal Einfrieren).
PBS-PUFFER: Tabletten. Phosphatgepufferte Salzlösung. Zur Herstellung von 100 mL PBS-Puffer 1 Tablette in destilliertem Wasser auflösen. BITTE BEACHTEN! Zur Herstellung der Waschlösung fügen Sie 0,3 mL TWEEN20 Reagenz zu je 100 mL PBS hinzu. Langsam mischen. (die anderen beiden Tabletten dienen als Reserve).	BUF WASH	4 Blisterpackungen mit je 3 Tabletten (Ausreichende Menge zur Herstellung von 1 Liter Waschlösung)	Nach der Entnahme aus der Blisterpackung müssen die Tabletten sofort aufgelöst werden
TWEEN20: Tween-20-Lösung.	TWEEN 20	1 x 10-mL-Vial	2-8 °C bis zum Verfallsdatum.
SUBSTRAT: Gebrauchsfertig. Reagenz mit 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin (TMB).	SUBS TMB	1 x 15-mL-Vial	2-8 °C bis zum Verfallsdatum.
STOPPLÖSUNG: Gebrauchsfertig. 0,5 M Schwefelsäurelösung.	STOP SOL	1 x 22-mL-Vial	2-8 °C bis zum Verfallsdatum.
KLEBEFOLIE FÜR MIKROTITERPLATTE		2	
KUNSTSTOFFBEUTEL		1	

*Bei den o.g. Werten handelt es sich lediglich um Sollwerte. Der tatsächliche Wert eines jeden Kalibrators ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

5. VORSICHTSMASSNAHMEN BEI DER ANWENDUNG

5.1. Sicherheitsmaßnahmen

- Die in den Reagenzien dieses Kits enthaltenen Ausgangsmaterialien menschlichen Ursprungs wurden mit zugelassenen Kits getestet und im Hinblick auf Anti-HIV-1-, Anti-HIV-2-, Anti-HCV-Antikörper und HBs-Antigen für negativ befunden. Es kann jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass derartige Produkte Hepatitis, das HI-Virus oder eine andere Virusinfektion übertragen können. Daher sind alle Ausgangsmaterialien menschlichen Ursprungs, einschließlich der zu testenden Proben, als potenziell infektiös zu behandeln.
- Beim Umgang mit Kitreagenzien oder Patientenproben Einweghandschuhe tragen und die Hände anschließend gründlich waschen. Spritzer vermeiden.
- Patientenproben und alle möglicherweise kontaminierten Materialien so dekontaminieren und entsorgen, als ob sie Infektionserreger enthalten würden. Zur optimalen Dekontamination wird mindestens einstündiges Autoklavieren bei 121,5 °C empfohlen.
- Vor der Abfallentsorgung gründlich verdünnen, um eine Bildung derartiger Produkte zu verhindern.



DIL CALO CAL

WARNUNG

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen

5.2. Sicherheitsvorkehrungen bei der Handhabung

- Kitkomponenten nicht nach Ablauf ihres Verfalldatums verwenden.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht mischen. Die Reagenzien-Chargennummern sind einer bestimmten Kitcharge zugewiesen. Nähere Informationen finden Sie im Qualitätskontrollbericht.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien und von Wasser. Halten Sie die Inkubationszeiten ein.

6. PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

6.1. Vor der Analyse

- Dieser Test ist für die Messung von PIIINP in **Humanserum- EDTA- oder Heparin-Plasmaproben** vorgesehen.

Im Rahmen zweier unabhängiger Studien wurden die Ergebnisse des P3NP-ELISA Kits zwischen gepaarten EDTA-Plasma-/Serumproben (n=39) und gepaarten Heparin-Plasma-/Serumproben (n=35) verglichen.

Eine Passing-Bablok-Regression dieser Proben ergab die folgenden Gleichungen:

$$\boxed{[\text{EDTA-Plasmakonz. } \mu\text{g/L}] = 0,997 \times [\text{Serumkonz. } \mu\text{g/L}] - 0,133 \mu\text{g/L}}$$

Der Pearson-Korrelationskoeffizient lautete $r = 0,99$

Das 95 %-Konfidenzintervall für die Steigung betrug 0,92 bis 1,08 und das 95 %-Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt betrug -0,68 bis 0,39 $\mu\text{g/L}$ für die 39 Patientenproben mit PIIINP-Konzentrationen von 3,42 bis 24,95 $\mu\text{g/L}$ in Serum

$$\boxed{[\text{Heparin-Plasmakonz. } \mu\text{g/L}] = 0,975 \times [\text{Serumkonz. } \mu\text{g/L}] + 0,11 \mu\text{g/L}}$$

Der Pearson-Korrelationskoeffizient lautete $r = 0,98$

Das 95 %-Konfidenzintervall für die Steigung betrug 0,88 bis 1,06 und das 95 %-Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt betrug -0,92 bis 0,72 $\mu\text{g/L}$ für die 35 Patientenproben mit PIIINP-Konzentrationen von 4,44 bis 29,0 $\mu\text{g/L}$ in Serum

- Die Serum- bzw. EDTA-Plasmaproben können vor dem Testen der PIIINP-Konzentration bis zu 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen gelassen werden.
- Die Serum- bzw. EDTA-Plasmaproben können entweder sofort verwendet oder bis zu 3 Tage bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Wenn der Test nicht innerhalb von 3 Tagen nach der Probenentnahme durchgeführt wird, müssen die Proben in aliquoten Teilen bei -20 °C eingefroren werden.
- Nach dem Auftauen Plasma bzw. Serum vorsichtig mischen. Vermeiden Sie mehrmaliges Einfrieren und Auftauen.

6.2. Vorverdünnung von Proben und Kontrollen (1/11)

- **Alle Proben und die Kit-Kontrollen müssen vor dem Testen 11-fach im mitgelieferten Verdünnungsmittel vorverdünnt werden** (z. B. 30 μL Probe + 300 μL Verdünnungsmittel **DIL CALO**). Das Gemisch vorsichtig mit einem Vortexmischer mischen.

- Wenn hohe PIIINP-Konzentration vermutet werden, sind möglicherweise zusätzliche Verdünnungen erforderlich.

7. TESTVERFAHREN

7.1. Benötigte Ausrüstung

- Präzisionsmikropipetten o.Ä. mit Einwegspitzen zur Ausgabe von 20, 50, 100, 200 und 1000 µL. Ihre Kalibrierung ist regelmäßig zu überprüfen.
- Destilliertes Wasser.
- Einweg-Kunststoffröhrchen.
- Vortexmischer
- Mikrotiterplatten-Washer (optional)
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Reader, zur Messung der Absorbanz bei 450 nm. Optional kann der Reader mit einem Filter zur Messung der Absorbanz bei einer Wellenlänge zwischen 610 nm und 650 nm (620 nm empfohlen) ausgestattet werden. Mit dieser zweiten Messung können Fehler der Mikrotiterplatte korrigiert werden.

7.2. Protokoll

- Alle Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor ihrem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25 °C) gebracht werden. Die Verteilung der Reagenzien auf die Vertiefungen erfolgt bei Raumtemperatur (18-25 °C).
- Jeder Kalibrator, jede Kontrolle bzw. Probe müssen in Doppelbestimmungen getestet werden.
- Legen Sie die Anzahl der für den Test benötigten Vertiefungen fest und entfernen Sie ungebrauchte Streifen. Bewahren Sie diese gut verschlossen im mitgelieferten Kunststoffbeutel mit Trockenmittel bei 2-8 °C auf.
- Rekonstituieren Sie die Kalibrator- und Kontroll-Vials. Überprüfen Sie genau, ob sich das Lyophilisat vollständig aufgelöst hat. Innerhalb von einer Stunde nach der Rekonstitution verwenden.

7.2.1 Herstellung der Waschlösung **WASH**

- Zur Sicherstellung von zuverlässigen und reproduzierbaren Ergebnissen empfiehlt sich eine genaue Befolgung der angegebenen Waschschrte; die Restmenge der Waschlösung muss so gering wie möglich sein. Die Verwendung eines Mikrotiterplatten-Washers wird empfohlen.

BITTE BEACHTEN! Die **BUF WASH** Tabletten sind zur Herstellung einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung vorgesehen. Pro 100 ml phosphatgepuffertes Kochsalzlösung müssen 0,3 mL **TWEEN 20** Lösung hinzugefügt werden, um die im Protokoll während der Waschschrte erwähnte **Waschpufferlösung WASH** herzustellen.

- Lösen Sie 1 **BUF WASH** Tablette in destilliertem Wasser auf, um 100 mL PBS-Puffer herzustellen.
- Fügen Sie 0,3 mL **TWEEN 20** Reagenz pro 100 mL Lösung hinzu und mischen Sie langsam.
- Beschriften Sie das Behältnis mit dieser Waschlösung als **WASH**. Die Lösung ist 1 Woche bei 2–8 °C stabil.

7.2.2 Anleitung - Halten Sie die Reihenfolge der Reagenzienzugabe ein

Siehe Laborprotokollblatt auf der Rückseite Vor der Verwendung des Laborprotokollblattes müssen Sie die Packungsbeilage vollständig gelesen haben.

Verdünnen Sie ggf. Proben mit vermuteten hohen PIIINP-Konzentrationen (> 30 µg/L) anhand des im Kit enthaltenen Verdünnungsreagenzes **DIL CAL0**.

1. Rekonstituieren Sie die Kalibratoren (1 mL) **CAL** und Kontrollen (0,25 mL) **CONTROL** durch die Zugabe von destilliertem Wasser, setzen Sie die Verschlusskappe wieder auf, drehen Sie das Vial einige Male um und vortexen Sie, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen.

Hinweis: Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig. NICHT vorverdünnen.

2. Bereiten Sie eine ausreichende Menge an Teströhrchen für die Vorverdünnung von Proben und Kontrollen vor und nummerieren Sie diese.
3. Legen Sie die Anzahl der für den Test benötigten Mikrotiterstreifen fest. Nehmen Sie ungebrauchte Streifen aus dem Rahmen und bewahren Sie sie bei 2-8 °C im gut verschlossenen Kunststoffbeutel auf.
4. **Proben und Kontrollen auf 1:11 vorverdünnen.**

- a. 300 µL Verdünnungsmittel **[DIL CALO]** in die Kunststoffröhrchen dispensieren
- b. 30 µL einer jeden Probe bzw. Kontrolle in jedes Röhrchen geben und behutsam mit einem Vortexmischer mischen

Hinweis: Vorverdünnte Proben und Kontrollen können 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25 °C) vor dem Test gelagert werden (>1 h nicht getestet).

5. Geben Sie 100 µL der Kalibratoren **[CAL]**, Kontrollen **[CONTROL]** und Proben im Doppelansatz in die entsprechenden Vertiefungen.
6. Geben Sie 100 µL Antikörper-HRP-Konjugat **[CONJ]** in die Vertiefungen.
7. Mit der Klebefolie abdecken und **3 h** bei Raumtemperatur (18-25 °C) **unter orbitalem Schütteln bei 700 U/min inkubieren.**
8. Waschen Sie die Vertiefungen wie folgt:
 - a. Leeren Sie den Inhalt aus den Vertiefungen
 - b. Verteilen Sie 300 µL Waschlösung **[WASH]**, die gemäß Anleitung im Abschnitt 7.2.1 zubereitet wurde.
 - c. Wiederholen Sie die Schritte a. und b. 2 weitere Male (insgesamt 3 Waschzyklen).
 - d. Zum Schluss aspirieren. Die restliche Waschlösungsmenge muss so gering wie möglich sein. Zur Entfernung von Restflüssigkeit kann die Platte behutsam ausgeklopft werden.
9. Dispensieren Sie **100 µL** TMB-Substrat **[SUBS TMB]** in jede Vertiefung.

Wichtig: Starten Sie die 15-minütige Inkubationszeit ab der ersten dispensierten Vertiefung.
10. Mit der Klebefolie abdecken und **15 min** bei Raumtemperatur (18-25 °C) **OHNE Schütteln** inkubieren. Eine Inkubation im Dunkeln ist nicht erforderlich.
11. Stoppen Sie die Reaktion, indem Sie **100 µL** Stopplösung **[STOP SOLN]** in jede Vertiefung geben.
12. Entfernen Sie die Klebefolie und messen Sie die Absorbanz (OD) innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung: Es empfiehlt sich, den äußeren Boden der Vertiefungen mit einem weichen, flusenfreien Tuch zu reinigen, um Fingerabdrücke oder Schmierflecken zu beseitigen.
 - Führen Sie eine Messung bei 450 nm durch (Optional: Führen Sie eine Messung bei einer Wellenlänge von 620 nm durch)

8. QUALITÄTSKONTROLLE

Die Gute Laborpraxis (GLP) verlangt, dass in jeder Testreihe Proben zur Qualitätskontrolle mitgeführt werden, um die Qualität der erzielten Ergebnisse zu überprüfen. Alle Patientenproben sind identisch zu behandeln, und es wird eine Analyse der Ergebnisse mithilfe geeigneter statistischer Methoden empfohlen.

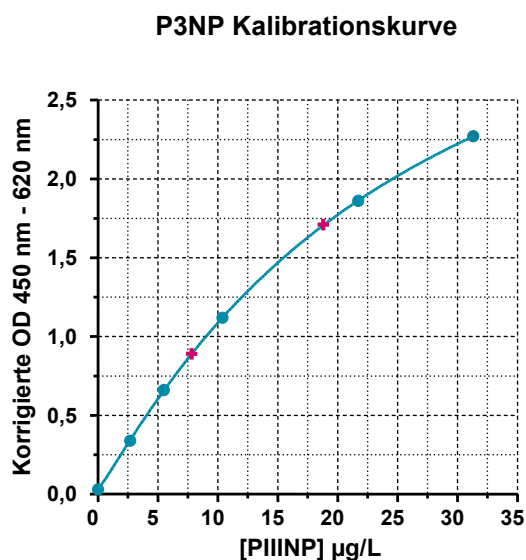
9. ERGEBNISSE

1. Optionale OD-Korrektur*: Subtrahieren Sie die Messwerte bei 620 nm von den Messwerten bei 450 nm.
2. Berechnen Sie für jede Doppelbestimmung die mittlere Absorbanz (OD) der Kalibratoren, Kontrollen und Proben.
3. Erstellen Sie eine Kalibrationskurve, indem Sie die (korrigierten)* mittleren OD-Werte bei 450 nm der Kalibratoren (y-Achse) gegen ihre auf dem Vial angegebene Konzentration (x-Achse) auftragen.
4. Für die Kalibrationskurven wird die **logistische 4-Parameter-Regression (4-PL)** empfohlen. Andere Datenreduktionsfunktionen ergeben möglicherweise leicht unterschiedliche Ergebnisse.

Lesen Sie die Werte der Proben von der Kurve ab und korrigieren Sie sie bei Bedarf um den zusätzlichen Verdünnungsfaktor. Das Vorverdünnungsverhältnis 1:11 ist bereits in den Kalibratorkonzentrationen kalkuliert.

Beispiel für Testdaten: nur zur Veranschaulichung; ersetzen in keinem Fall die im Labor erzielten Ergebnisse.

	Konzentration µg/L (siehe Vials)	Korrigierte* OD 450-620 nm
CAL0	0	0,02
CAL1	2,7 (Beispiel)	0,34
CAL2	5,5 (Beispiel)	0,66
CAL3	10,4 (Beispiel)	1,12
CAL4	21,7 (Beispiel)	1,86
CAL5	31,3 (Beispiel)	2,27
KONTROLLE 1:	7,8 (Beispiel)	0,89
KONTROLLE 2:	18,8 (Beispiel)	1,71



10. GRENZEN DES VERFAHRENS

- Trübe, hämolytische, hyperlipämische bzw. fibrinhaltige Proben liefern möglicherweise ungenaue Ergebnisse.
- Die Probenwerte nicht bis über den letzten Standard hinaus extrapolieren. Die betreffenden Proben verdünnen und erneut testen.

11. LEISTUNGSDATEN

11.1. Messbereich des Tests

Die Proben müssen im Bereich zwischen der unteren Nachweisgrenze und der höchsten Konzentration des Kalibrationsbereichs gemessen werden.

11.2. Rückführbarkeit

Die zugewiesenen PIIINP-Werte des P3NP-ELISA Kits werden in Mikrogramm pro Liter (µg/L) ausgedrückt und sind auf einen internen Standard aus Humanserumproben standardisiert, der auf eine quantitative Referenzmethode rückführbar ist.

11.3. Präzision

11.3.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation (innerhalb der Serie) wurde anhand von 31 Messungen von drei Serumproben bestimmt, die den gesamten Messbereich der Kalibrationskurve abdecken.

Präzision innerhalb der Serie

Probe	1	2	3
Az	31	31	31
Mittelwert (µg/L)	5,2	13,4	25,5
VK (%)	2,2	2,4	3,6

11.3.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation (zwischen Serien) wurde anhand von 3 Serumproben bestimmt, die in 8 Serien in Doppelbestimmungen gemessen wurden.

Präzision zwischen Serien

Probe	1	2	3

Az	8	8	8
Mittelwert (µg/L)	5,3	13,1	25,0
VK (%)	6,5	8,0	7,3

11.4. Nachweisgrenze

- Die Nachweisgrenze (LoD bzw. analytische Sensitivität) des P3NP-ELISA Kits ist definiert als die niedrigste nachweisbare Konzentration, die sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von Null unterscheidet, berechnet mittels Zugabe von 2 Standardabweichungen zum Mittelwert von 30 Replikatanalysen des Nullkalibrators (CAL0).

Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)

LoD 2σ	0,036 µg/L
--------	-------------------

- Die Bestimmungsgrenze (LoQ bzw. funktionelle Sensitivität) des P3NP-ELISA Kits ist definiert als die Konzentration, die mit dem Unpräzisionsprofil bei einem Variationskoeffizient zwischen Serien von 12,5 % gemessen wird. Sie wurde anhand des Testens von 9 Serumproben in Doppelbestimmungen in 8 Serien untersucht. Die mittlere Standardabweichung und der VK in % wurden hierauf für jede Probe berechnet und eine Power-Varianz-Funktion mit 3 Parametern wurde für die Anpassung verwendet.

Funktionelle Sensitivität (Bestimmungsgrenze)

LoQ 12,5%VK	2,2 µg/L
-------------	-----------------

11.5. Antigen-Wiederfindung

PIIINP-Lösungen aus den Kalibratoren 2 bis 5 wurden im Verhältnis 1:1 mit 2 Serumprobenpools mit verschiedenen PIIINP-Ausgangskonzentrationen gemischt. Jede Probe (unversetzt und versetzt) wurde in Doppelbestimmungen in einer Serie getestet. Die PIIINP-Konzentrationen wurden gemessen und die prozentuale Wiederfindung berechnet.

Wiederfindung

Probe	1	2
Konzentration (µg/l)	3,0	7,1
Mittlere Wiederfindung (%)	91	95
Wiederfindungsbereich (%)	88 – 92	92 – 97

11.6. Verdünnungslinearität

Studien zur Beurteilung der Linearität des Tests wurden anhand von 4 Serumproben mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Proben wurden unverdünnt getestet und mit DIL-CAL0 seriell verdünnt (Verdünnungsfaktor auf 1:16).

Verdünnung

Probe	3	4	5	6
Konzentration (µg/L)	27,7	22,1	24,1	24,5
Verdünnungsbereich (%)	1:2 auf 1:16	1:2 auf 1:16	1:2 auf 1:16	1:2 auf 1:16
Mittlere Wiederfindung (%)	101	104	99	102
Wiederfindungsbereich (%)	94 - 107	100 - 109	96 - 101	100 – 104

Linearität

Achsenabschnitt	0,18	0,30	-0,11	0,13
Steigung (Y=gemessen)	1,00	1,00	1,00	0,99
R²	0,99	0,99	0,99	0,99

Diese Ergebnisse zeigen die gute Linearität des Verdünnungstests über den berichteten Messbereich des Tests.

11.7. Spezifität

Die Spezifität des Tests ist durch die Verwendung von zwei komplementären monoklonalen Antikörpern gewährleistet. Die in dem

Kit verwendeten monoklonalen Antikörper sind spezifisch für das N-terminale Prokollagen-III-Peptid. Das PIIINP-Peptid kann durch Proteolyse in Col-1-Fragmente abgebaut werden, die vom P3NP-ELISA Kit nicht erkannt werden.

11.8. Hook-Effekt

Es wurde kein Hook-Effekt bei diesem Test bis zu 200 µg/L beobachtet.

11.9. Interferenzen

Eine Interferenzstudie wurde gemäß CLSI EP17-A2 durchgeführt. Die Messungen wurden anhand von 4 bis 6 Replikaten mit 2 Probenkonzentrationen (niedrig und mittel der Standardkurve) durchgeführt. Eine nicht-signifikante Interferenz wurde als Differenz innerhalb ±10 % von der Kontrolle (unversetzte Probe) definiert. Beim Testen von Plasmaproben mit den folgenden Substanzen wurde keine Interferenz beobachtet:

- Triglyceride aus hyperlipidämischem EDTA-Plasma (Humanprobe – 743,4mg/dL TG gesamt und halbverdünnt)
- Triglyceride aus einer im Handel erhältlichen Intralipidlösung (30 mg/L)
- Humanes Albumin (bis zu 60 mg/mL versetzt)
- Bilirubin (0,15 mg/mL)
- Humanes Hämoglobin (2 mg/mL)
- Methotrexat (2 mM)
- Gallensäuren (bis zu 35µM)

HINWEIS: Triton X-100 interferierte leicht mit diesem Test (max. -14 % Bias), wenn die Proben mit 0,1 % dieser Substanz ergänzt werden.

ACHTUNG: Der Immunoassay ist vor möglichen Interferenzen mit **heterophilen Antikörpern** wie HAMA und Rheumafaktoren (RF) geschützt. Dennoch können wir nicht garantieren, dass falsch-positive oder negative Ergebnisse infolge des Vorhandenseins von heterophilen Antikörpern in einer Patientenprobe vollständig ausgeschlossen sind.

12. ERWARTETE NORMALWERTE

Zur Bestimmung des Normalbereichs des P3NP-ELISA wurden 120 Proben (EDTA-Plasma) von offensichtlich gesunden Spendern anhand des P3NP-ELISA Kits analysiert.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle in µg/L aufgeführt:

P3NP-ELISA Erwartete Normalwerte (µg/L PIIINP)

Mittelwert	Medianwert	5. Perzentile	95. Perzentile	Min	Max
4,9	4,6	2,9	8,1	2,1	13,1

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Normalwerte ermittelt. Die unten angegebenen Werte sind Richtwerte.

13. METHODENVERGLEICH .

Die Ergebnisse des P3NP-ELISA Kits wurden im Rahmen einer Studie mit dem RIA-gnost® PIIP (Cisbio Bioassays) anhand von 37 Serumproben verglichen.

- Die vom RIA-gnost® PIIP Test berichtete Äquivalentkonzentration in Bezug auf µg/l Einheiten wurde mittels Multiplikation der Ergebnisse des RIA Kits (E/mL) mit dem Faktor 8 zum Erhalt von µg/l erzielt, wie in der Anleitung des RIA-gnost PIIP® Kits erläutert.

Eine Passing-Bablok-Regression dieser Proben ergab die folgende Gleichung:

$$[\text{P3NP- ELISA}] (\mu\text{g/L}) = 0,94 \times [\text{RIA-gnost PIIP}] (\mu\text{g/L}) + 1,12 \mu\text{g/L}$$

Der Pearson-Korrelationskoeffizient lautete $r = 0,962$

Das 95 %-Konfidenzintervall für die Steigung betrug 0,81 bis 1,04 und das 95 %-Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt betrug 0,41 bis 2,00 µg/L für die 37 Patientenproben mit PIIINP-Konzentrationen von 3,23 bis 24,9 µg/L (wie mit dem P3NP-ELISA Test gemessen)

- Ohne Anwendung eines Umwandlungsfaktors für den RIA-gnost® PIIP Test ergab sich die folgende Gleichung:

$$[\text{P3NP- ELISA}] (\mu\text{g/L}) = 7,76 \times [\text{RIA-gnost PIIP}] (\text{U/mL}) + 0,99 \text{ U/mL}$$

Der Pearson-Korrelationskoeffizient lautete $r = 0,962$

Das 95 %-Konfidenzintervall für die Steigung betrug 6,89 bis 8,66 und das 95 %-Konfidenzintervall für den Achsenabschnitt betrug -0,04 bis 1,66 µg für die 37 Patientenproben mit PIIINP-Konzentrationen von 3,23 bis 24,9 µg/L (wie mit dem P3NP-ELISA Test gemessen)

14. BIBLIOGRAPHIE

1. Fernandes f. et al. *J Clin Gastroenterol* 2015;49:235–241
2. Holt et al. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013; 17(Suppl1): S18-S22.
3. Pathirana D, et al. *JEADV* 2009; 23 (Suppl. 2), 5-70.
4. Potts et al. *Br J Dermatol.* 2017 ;177(3): 637-44
5. Safdar et al, *Int J Cardiovasc Res* 2015, 4:2
6. Tanwar S, et al. *Hepatology.* 2013 Jan;57(1):103-11
7. Van Der Reeks et al. *Br J Dermatol.* 2017; 177(5):1454-57



LABORPROTOKOLLBLATT

Verwenden Sie dieses Blatt nicht, bevor Sie die gesamte Packungsbeilage gelesen haben.

↪ Verdünnen Sie ggf. Proben mit vermuteten hohen PIIIINP-Konzentrationen anhand des im Kit enthaltenen Verdünnungsreagenzes **DIL** **CAL0**.

1. REKONSTITUIEREN Kalibratoren (1 mL) und Kontrollen (0,25 mL) mit dH₂O rekonstituieren **CAL** **CONTROL**

Hinweis: Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig. NICHT VORVERDÜNNEN.

2. VORVERDÜNNEN Proben und Kontrollen auf 1:11 vorverdünnen **DIL** **CAL0** **SAMPLE** **CONTROL**

Eine ausreichende Menge an Röhrcchen für die Vorverdünnung vorbereiten

↓ In jedes Röhrcchen **300 µL** Verdünnungsmittel dispensieren

↓ **30 µL** einer jeden Probe bzw. Kontrolle in die Kunststoffröhrcchen geben und behutsam mit einem Vortexmischer mischen

1:11 Vorverdünnung

3. PROBEN IN DIE MIKROTITERPLATTE GEBEN **SAMPLE** **CAL** **CONTROL**

↓ **100 µL** der Kalibratoren, vorverdünnten Kontrollen und Proben im Doppelansatz in die entsprechenden Vertiefungen geben.

+ 100 µL



4. KONJUGAT DISPENSIEREN **CONJ**

↓ **100 µL** Antikörper-HRP-Konjugat in die Vertiefungen dispensieren.

+ 100 µL



5. INKUBIEREN

Mit der Klebefolie abdecken und **3 h** bei Raumtemperatur (18-25 °C) **unter Schütteln bei 700 rpm inkubieren.**

3 h

↻ 700 rpm



6. WASCHEN (siehe 7.2.1) **WASH**

Waschlösung zubereiten = 1 Tablette + 100 mL dH₂O + 0,3 mL Tween20 pro 100 mL

Vertiefungen mit **3 Zyklen waschen** **Aspirieren → 300 µL Waschlösung verteilen**

Zum Schluss aspirieren. Die restliche Lösungsmenge muss so gering wie möglich sein. Zur Entfernung von Restflüssigkeit kann die Platte behutsam ausgeklopft werden.

3 x 300 µL



7. SUBSTRAT DISPENSIEREN **SUBS** **TMB**

↓ **100 µL** TMB-Substrat in jede Vertiefung dispensieren und die 15-minütige Inkubationszeit ab der ersten dispensierten Vertiefung starten

+ 100 µL



8. INKUBIEREN

Mit der Klebefolie abdecken und **15 min** bei Raumtemperatur (18-25 °C) **OHNE Schütteln** inkubieren. Eine Inkubation im Dunkeln ist nicht erforderlich.

15 min



9. STOPPLÖSUNG DISPENSIEREN **STOP** **SOLN**

↓ **100 µL** Stopplösung in jede Vertiefung dispensieren

+ 100 µL



10. MESSEN

🏠 Messung bei **450 nm** innerhalb von 30 min durchführen – **4PL-Kurvenanpassung** für Dateninterpolation
Optional: Messung bei einer Wellenlänge von 620 nm durchführen

450 nm





FRA

Modifications par rapport à la version précédente :

Changement de volume DIL/CAL0, mise à jour des informations nécessaires à l'obtention des instructions d'utilisation.

ENG

Changes from the previous version:

Change into DIL/CAL0 volume, updating of the information necessary to obtain the instructions for use.

DEU








Änderungen gegenüber der Vorgängerversion:

Änderung Volumen DIL/CAL0, Aktualisierung der nötigen Informationen zum Erhalt der Gebrauchsanweisung.

SWE

Ändringar från föregående utgåva:

Ändra till volym DIL/CAL0, och uppdatera den nödvändiga informationen för att erhålla bruksanvisning.

	FRA	ENG	DEU	SWE
	Limite de température	Temperature limitation	Temperaturbegrenzung	T°-gräns vid förvaring
LOT	Code du lot	Batch code	Chargencode	Lotnr.
	Utiliser jusqu'au	Use by	Verwendbar bis	Används senast
	Consulter la notice d'utilisation	Consult instructions for use	Das Handbuch zu Rate ziehen	Läs bruksanvisningen
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	In vitro medical device	In-VitroDiagnostische Anwendung	Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik
	Fabricant	Manufacturer	Hersteller	Tillverkad av
REF	Référence du catalogue	Catalogue number	Katalog Nr.	Referens
	Suffisant pour	Sufficient for	Ausreichend für	Antal rör
	Conserver à l'abri de la lumière du soleil	Keep away from sunlight	Vor Sonnenlicht schützen	Utsätt inte för direkt sol i jus
	Risques biologiques	Biological Risks	Biogefährdung	Biologisk risk
CONJ	Conjugué	Conjugate	Komplex	Konjugat
CAL	Calibrateur	Calibrator	Kalibrator	Kalibrator
CONTROL	Contrôle	Control	Kontrolle	Kontroll
TWEEN 20	Solution concentrée	Concentrated solution	Konzentrierte Lösung	Koncentrerad lösning
MICROPLATE	Microplaque	Microplate	Mikrotiterplatte	Mikroplattan
BUF WASH	Tampon	Buffer	Puffer	Buffert
DIL CAL	Diluant	Diluent	Verdünnungs-mittel	Spädningsmedel
SUBS TMB	Substrat	Substrate	Substrat	Substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt	Stop solution	Stopplösung	Stopplösning