



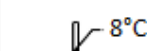
P3NP-ELISA

N-terminal prokollagen III-peptid



www.cisbio.com/ivd-pi

Bruksanvisning - SWE



Dokumentreferens: 10 - Mars 2023

1. NAMN OCH AVSEDD ANVÄNDNING

P3NP-ELISA är en immunanalys för kvantitativ diagnostisk mätning *in vitro* av N-terminal prokollagen III-peptid (PIIINP) i serum, EDTA eller heparinplasma.

Setet är avsett för *in vitro* diagnostisk användning.

2. INTRODUKTION

Prokollagen av typ III syntetiseras i fibroblaster som en biosyntetisk prekursor till kollagen, typ III och frisätts sedan. Propeptiderna delas i det extracellulära rummet under konverteringen till kollagen. N-terminal propeptid (PIIINP; MW 45000) bildas under denna process i ekvimolara proportioner till kollagen typ III och tas upp i cirkulationen.

Blodströmsnivån av PIIINP kan därför användas som ett mått på kollagen III-syntes.

2.1 Klinisk signifikans av kvantitativt fastställande av N-terminal prokollagen III-peptid

De huvudsakliga kollagener som finns i leverns bindväv är av typerna I och III. Om det förekommer aktiv bindvävsproliferation (fibros) i levern, till följd av patologiska tillstånd, bildas ökade mängder av N-terminal prokollagen III-peptid.

Transformation av fungerande levervävnad till bindväv kan spåras med hjälp av förhöjd nivå av N-terminal prokollagen III-peptid i blodet. Detta är till exempel fallet vid:

- alkohol- eller virusinducerad leverfibros och levercirros
- fall med icke-alkoholrelaterad steatohepatit (NASH) [1].

De europeiska S3-riktlinjerna om systemisk behandling av *psoriasis vulgaris* rekommenderar att PIIINP-mätningar bör ingå i laboratoriekontroller för att övervaka risken för leverfibros hos psoriasispatienter som får metotrexatbehandling [2].

2.2 Patologiska värden

Patologiska tillstånd som påverkar levern, vilka förknippas med aktiv bindvävsproliferation, ger en höjning av förhöjda PIIINP-värden i serum. Transformationen av fungerande levervävnad till bindväv kan därför spåras genom mätning av P3NP i serumet. Enligt sjukdomens svårighetsgrad är PIIINP förhöjt i serum vid kroniskt aktiv hepatit, fibros och levercirros.

Nivåerna vid kronisk persisterande hepatit ligger vanligen inom normalt intervall. Prokollagen III-peptid kan vara förhöjt vid degeneration av levern.

Vid akut hepatit förhöjs också prokollagen III-peptid i serumet.

Det finns dock andra tillstånd där PIIINP är förhöjt utan en spårbar förändring i levern (t.ex. lungfibros [3], reumatiska sjukdomar, hjärtinfarkt [4], akromegali, multipla skador).

Den diagnostiska betydelsen ligger i övervakning av sjukdomsförloppet. Det finns ett tydligt samband med histologiska fynd vid fibros och cirros.

3. PRINCIP

P3NP-ELISA-setet är en **enstegs kolorimetrisk immunanlys av sandwich-ELISA**-typ. En monoklonal antikropp, immobiliserad på mikroplattan, fångar upp PIIINP-proteiner som finns i kalibratorerna och proverna och de bundna proteinerna och känns därefter igen av en annan monoklonal antikropp som är konjugerad till pepparrotsperoxidas (HRP). De obundna reagenserna elimineras genom tvätt. Den kolorimetriska reaktionen påbörjas därefter genom att ett HRP-substrat, TMB (3,3',5,5' tetrametylbensidin) tillsätts. Reaktionen stoppas genom att en svavelsyrelösning tillsätts, den optiska densiteten (OD) för varje brunn avläses vid 450 nm. OD-värdena är proportionerliga till koncentrationerna av PIIINP-protein som fanns i kalibratorerna och proverna.

4. REAGENSER

Varje set innehåller tillräckligt med reagenser för 96 tester. Utgångsdatumet är angivet på den yttre etiketten på setet.

Före öppnande måste alla reagenser förvaras vid 2–8 °C till angivet utgångsdatum.

Efter öppnande kan setet användas under 6 veckor vid förvaring av reagenserna enligt nedanstående beskrivning:

REAGENSER	SYMBOLER	MÄNGD	FÖRVARING EFTER ÖPPNANDE
MIKROPLATTA: bruksfärdig. Monoklonala anti-PIIINP-antikroppar från mus, immobiliserade på brunnarnas yta.	MICROPLATE	1 platta (96 brunnar) (foliepåse med torkmedel)	Efter öppnandet kan oanvända remsor förvaras vid 2-8 °C i den medföljande plastpåsen med torkmedel, ordentligt försluten, under 6 veckor.
KONJUGAT: bruksfärdig. Buffrad lösning som innehåller monoklonala anti-PIIINP-antikroppar från mus kopplade till pepparrotsperoxidas, immunglobuliner mot mus, stabiliseringsmedel och konserveringsmedel.	CONJ	1 x 12 ml flaska	Efter öppnande ska lösningen förvaras vid 2-8 °C och användas inom 6 veckor.
SPÄDNINGSVÄTSKA – KALIBRATOR 0 (KAL 0): bruksfärdig. Buffrad lösning som innehåller proteiner från nötkreatur, konserveringsmedel och en gulorange färg.	DIL CAL0	1 x 35 ml flaska	Efter öppnande ska lösningen förvaras vid 2-8 °C och användas inom 6 veckor.
KALIBRATORER (KAL 1 – KAL 5): frystorkade. Frystorkad buffrad lösning som innehåller serum från kalvfoster, proteiner från nötkreatur, konserveringsmedel och en gulorange färg. 2,5 – 5 – 10 – 20 – 30 µg/l* Späd med 1 ml destillerat vatten, sätt på locket igen, vänd upp och ner flera gånger och blanda med hjälp av en vortexblandare för att säkerställa fullständig spädning.	CAL	5 flaskor qs 1 ml	Efter spädning får beredningen inte förvaras längre än 3 timmar i rumstemperatur. Förvara vid 2-8 °C i högst 1 vecka eller dela upp i aliquoter och frys vid < -16 °C under 6 veckor (högst 1 fryssteg).
KONTROLLER 1 & 2 (låg och hög): frystorkade. Frystorkad humanplasma +/- serum från kalvfoster Späd med 0,25 ml destillerat vatten, sätt på locket igen, vänd upp och ner flera gånger och blanda med hjälp av en vortexblandare för att säkerställa fullständig spädning. De faktiska acceptansgränsvärdena är tryckta på flaskans etikett.	CONTROL	1 flaska vardera qs 0,25 ml	Efter spädning får beredningen inte förvaras längre än 3 timmar i rumstemperatur. Förvara vid 2–8 °C i högst 1 vecka eller dela upp i aliquoter och frys vid < -16 °C under 6 veckor (högst 1 fryssteg).
PBS-BUFFERT: tabletter. Fosfatbuffrad saltlösning. Lös upp 1 tablett i destillerat vatten för att bereda 100 ml PBS-buffert. WARNING! Tillsätt 0,3 ml TWEEN20-reagens till varje 100 ml PBS-buffert och blanda sakta för att preparera tvättbuffertlösningen. (De återstående 2 tabletterna tillhandahålls vid behov).	BUF WASH	4 blisterförpackningar med 3 tabletter i vardera (tillräcklig mängd för att preparera 1 liter tvättbuffertlösning)	Efter öppnande av blisterförpackningen måste tabletterna lösas upp omedelbart
TWEEN20: Tween-20-lösning.	TWEEN 20	1 x 10 ml flaska	2–8 °C fram till utgångsdatumet.
SUBSTRAT: bruksfärdig. Reagens innehållande 3, 3', 5, 5' tetrametylbensidin (TMB).	SUBS TMB	1 x 15 ml flaska	2–8 °C fram till utgångsdatumet.
STOPPLÖSNING: bruksfärdig. 0,5 M svavelsyrelösning.	STOP SOL	1 x 22 ml flaska	2–8 °C fram till utgångsdatumet.
SLÄLVHÄFTANDE FILM FÖR MIKROPLATTAN		2	
PLASTPÅSE		1	

*Värdena som anges ovan är endast målvärden. De verkliga värdena för varje kalibrator visas på etiketten.

5. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER VID ANVÄNDNING

5.1. Säkerhetsåtgärder

- Råmaterialet från människa i reagenserna i detta set har testats med licensierade set och har befunnits vara negativa för anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV-antikroppar och HBs-antigen. Det är emellertid fortfarande omöjligt att fullständigt garantera att sådana produkter inte kan överföra hepatit, HIV-virus eller andra virusinfektioner. Därför måste alla råmaterial från människa, inklusive proverna som ska analyseras, behandlas som potentiellt smittsamma.
- Använd engångshandskar vid hantering av reagenser i setet eller prover och tvätta händerna noga efteråt. Undvik stänk.
- Dekontaminera och kassera prover och allt potentiellt kontaminerat material som om det var potentiellt smittsamt. Den bästa dekontamineringsmetoden är autoklavering under minst en timme i 121,5 °C.
- Vid kassering av avfall, späd noga för att undvika att sådana produkter bildas.



DIL **CAL0** **CAL**

VARNING
H317: kan orsaka allergisk hudirritation

5.2. Försiktighetsåtgärder vid hantering

- Använd inte setets komponenter efter angivet utgångsdatum.
- Blanda inte reagenser från olika partier. Reagensernas partinummer tillskrivs ett specifikt set-lot. Information finns i kvalitetskontrollrapporten.
- Undvik mikrobiell kontaminering av reagenserna och vattnet. Följ inkubationstiderna.

6. PROVTAGNING OCH PREPARERING

6.1. Före analys

- Denna analys är avsedd för mätning av PIIINP i **humant serum, EDTA eller heparinplasma**.

Två oberoende studier utfördes för att jämföra resultaten av P3NP-ELISA-setet mellan ihopparade EDTA-plasma-/serumprover (n=39) och ihopparade heparinplasma-/serumprover (n=35)

En Passing-Bablok-regressionsanalys tillämpades på dessa prover, vilket gav följande ekvationer:

[Plasma EDTA-konc µg/L] = 0,997 x [Serumkonc µg/L] – 0,13 µg/L, Pearson-korrelationskoefficienten var **r = 0,99**
Konfidensintervallet på 95 % för lutningen var 0,92 till 1,08 och konfidensintervallet på 95 % för spärren var -0,68 till 0,39 µg/L för de 39 patientproverna med PIIINP-koncentrationer med ett intervall från 3,42 till 25,0 µg/L i serum.

[Plasma Heparinkonc µg/L] = 0,975 x [Serumkonc µg/L] + 0,11 µg/L Pearson-korrelationskoefficienten var **r = 0,99**
Konfidensintervallet på 95 % för lutningen var 0,88 till 1,06 och konfidensintervallet på 95 % för spärren var -0,92 till 0,72 µg/L för de 35 patientproverna med PIIINP-koncentrationer med ett intervall från 4,44 till 29,0 µg/L i serum.

- Prover från serum eller EDTA-plasma kan stå i rumstemperatur (18-25 °C) i max 4 timmar innan analys av PIIINP-koncentration.
- Prover från serum eller EDTA-plasma kan användas omedelbart eller förvaras vid 2–8 °C under upp till 3 dagar. Om testet inte körs inom 3 dagar efter provtagning måste proverna delas upp i alikvoter och frysas vid -20 °C.
- Plasma eller serum måste blandas noga efter att de har tinats upp. Undvik upprepad frysning och upptining.

6.2. Förspädning av prover och kontroller (1/11)

- **Alla prover och setkontrollen måste förspädas 11 gånger i spädningsvätskan som medföljer setet** (t.ex. 30 µl prov + 300 µl spädningsvätska **DIL****CAL0**) innan de analyseras. Blanda blandningen varsamt med hjälp av en vortexblandare.
- Om höga PIIINP-nivåer misstänks kan ytterligare spädningar behövas.

7. ANALYSPROCEDUR

7.1. Utrustning som behövs

- Precisionsmikropipetter eller liknande utrustning med engångsspetsar för fördelning av 20, 50, 100, 200 och 1 000 µl. Kalibreringen av dessa måste kontrolleras regelbundet.
- Destillerat vatten.
- Plaströr för engångsbruk.
- Vortexblandare.
- Tvättanordning för mikroplatta (valfritt).
- Skakare för mikroplatta
- Avläsare för mikroplatta, som kan mäta absorbans vid 450 nm. Alternativt kan avläsaren förses med ett filter som kan avläsa absorbans på en våglängd mellan 610 nm och 650 nm (620 nm rekommenderas). Denna andra avläsning möjliggör korrigerande av mikroplattans felaktigheter.

7.2. Tillvägagångssätt

- Alla reagenser måste anta rumstemperatur (18–25 °C) i minst 30 minuter innan de används. Reagenserna tas upp och fördelas i brunnarna vid rumstemperatur (18–25 °C).
- Varje kalibrator, kontroll eller prov måste testas dubbelt.
- Fastställ antal brunnar som behövs för analysen och avlägsna oanvända remsor. Förvaras vid 2–8 °C i plastpåsen som tillhandahålls för detta ändamål, med torkmedel, och ordentligt försluten.
- Späd flaskorna med kalibratörer och kontroll. Kontrollera noga att allt det frystorkade medlet löses upp och använd det inom en timme efter spädning.

7.2.1 Beredning av tvättlösningen **WASH**

- För att erhålla tillförlitliga och reproducerbara resultat rekommenderas att tvättstegen utförs enligt vad som anges. Den resterande tvättlösningens volymen måste vara så låg som möjligt. Det rekommenderas att en tvättanordning för mikroplatta används.

FÖRSIKTIGHET! **BUF**/**WASH**-tabletterna är avsedda för att preparera en fosfatbuffrad saltlösning. Det är obligatoriskt att tillsätta 0,3 ml **TWEEN 20**-lösning för varje 100 ml fosfatbuffrad saltlösning för att bilda tvättbuffertlösningen **WASH** som nämns i protokollet under tvättstegen.

- Lös upp 1 **BUF**/**WASH**-tablett i destillerat vatten för att bereda 100 ml PBS-buffert
- Tillsätt 0,3 ml **TWEEN 20**-reagens till varje 100 ml lösning och blanda sakta.
- Märk behållaren med denna tvättlösning med **WASH**. Denna lösning är stabil under 1 vecka vid 2–8 °C.

7.2.2 Instruktioner - följ ordningen i vilken reagenserna ska tillsättas

Se laboratorieprotokollkortets baksida. Det är viktigt att läsa igenom bipacksedeln i detalj innan laboratorieprotokollkortet används.

Om det är tillämpligt, späd proverna med de förmodade höga PIINP-koncentrationerna (> 30 µg/l) med spädningssvetskan **DIL**/**CAL0**-reagens som medföljer setet.

1. Späd kalibratörer (1 ml) **CAL** och kontroller (0,25 ml) **CONTROL** genom att tillsätta destillerat vatten, sätta på locket igen, vända flaskan upp och ner flera gånger och blanda med hjälp av en vortexblandare för att säkerställa fullständig spädning.

Obs! Kalibratörerna är bruksfärdiga. Förspäd dem INTE

2. Preparera och numrera ett tillräckligt antal provrör för att utföra förspädning av prover och kontroller.
3. Fastställ antalet mikrotiterbrunnremsor för analysen. Avlägsna oanvända remsor från ramhållaren och förvara dem vid 2–8 °C i den självhäftande påsen, ordentligt försluten.
4. **Förspäd prover och kontroller till 1:11.**
 - a. Fördela 300 µl av spädningssvetskan **DIL**/**CAL0** i plaströren.
 - b. Tillsätt 300 µl av varje prov eller kontroll i varje rör och blanda försiktigt med hjälp av en blandare av vortextyp.

Obs! Förspädda prover och kontroller kan förvaras under 1 timme i rumstemperatur (18–25 °C) före analysen (>1 tim. inte testat).

5. Tillsätt 100 µl av kalibratörerna **CAL**, kontrollerna **CONTROL** och proverna i lämpliga brunnar i dubbla uppsättningar.

6. Fördela 100 µl HRP-antikropps-konjugat **CONJ** i brunnarna.
7. Täck över med självhäftande film och inkubera i **3 tim.** i rumstemperatur (18–25 °C) **under orbital skakning vid 700 varv/min.**
8. Tvätta brunnarna enligt nedan:
 - a. Avlägsna innehållet i brunnarna.
 - b. Fördela 300 µl tvättlösning **WASH**, preparerad enligt beskrivningen i avsnitt 7.2.1.
 - c. Upprepa steg a. och b. 2 gånger ytterligare för totalt 3 tvättcykler.
 - d. Avsluta med aspiration. Den resterande tvättlösningens volymen måste vara så låg som möjligt. Det är möjligt att försiktigt slå på plattan upp och ned för att ta bort den kvarvarande vätskan.

9. Fördela **100 µl** TMB-substrat **SUBS/TMB** i alla brunnar.

Viktigt: starta inkubationstiden på 15 minuter när den första brunnen har fyllts.

10. Täck över med självhäftande film och slutför inkubationen på **15 min.** i rumstemperatur (18–25 °C) **UTAN skakning.** Inkubering i mörker är inte nödvändigt.
11. Stoppa reaktionen genom att tillsätta **100 µl** stopplösning **STOP/SOLN** i alla brunnar.
12. Avlägsna den självhäftande filmen och mät absorbansen (OD) inom 30 minuter efter att stopplösningen har tillsatts: det rekommenderas att utsidan av brunnarnas botten rengörs med en luddfri mjuk servett för att avlägsna eventuella fingeravtryck eller smutsfläckar
 - Läs av vid 450 nm (valfritt: läs av vid en våglängd på 620 nm).

8. KVALITETSKONTROLL

God laboratoriesed kräver användning av kvalitetskontrollprover i varje analysserie för att kontrollera kvaliteten på de erhållna resultaten. Alla prover ska behandlas likadant och det rekommenderas att resultatanalys utförs med användning av lämpliga statistiska metoder.

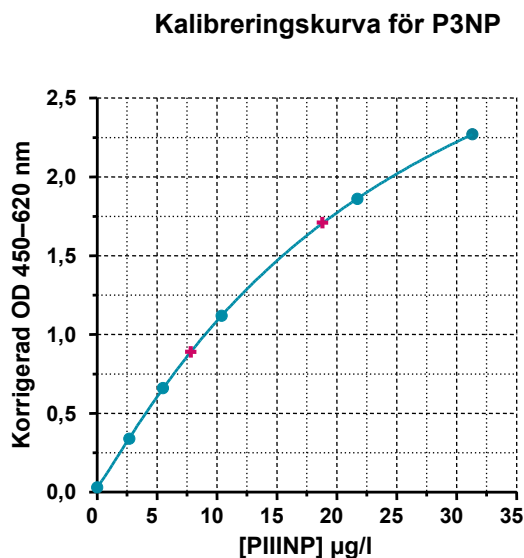
9. RESULTAT

1. Valfri OD-korrigering*: dra ifrån värdena som avlästes vid 620 nm från värdena vid 450 nm.
2. Beräkna medelabsorbansen (OD) för kalibratorer, kontroller och prov för varje duplikat.
3. Skapa en kalibreringskurva genom att markera (korrigerad*) medel-OD-värdena vid 450 nm för kalibratorer (Y-axel) mot deras koncentration (x-axel) som anges på flaskan.
4. **4-parameterlogistikens (4-PL)** matematiska anpassningsmodell rekommenderas för kalibreringskurvor. Andra datareduktionsfunktioner kan ge något skilda resultat.

Avläs värdena för proverna från kurvan och korriger dem med ytterligare spädningfaktor vid behov. Förspädningkvoten 1:11 är redan beräknad i kalibratorkoncentrationer.

Exempel på analysdata: **endast för illustration** och får inte under några omständigheter ersätta resultat erhållna i laboratoriet.

	Koncentration µg/l (se flaskorna)	Korrigerad* OD 450-620 nm
KAL0	0	0,02
KAL1	2,7 (exempel)	0,34
KAL2	5,5 (exempel)	0,66
KAL3	10,4 (exempel)	1,12
KAL4	21,7 (exempel)	1,86
KAL5	31,3 (exempel)	2,27
KONTROLL 1	7,8 (exempel)	0,89
KONTROLL 2	18,8 (exempel)	1,71



10. PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

- Prover som uppvisar grumlighet, hemolys, hyperlipemi eller innehåll av fibrin kan ge felaktiga resultat.
- Extrapolera inte provvärdena utöver den senaste standarden. Späd de berörda proverna och gör om testet igen.

11. PRESTANDAEGENSKAPER

11.1 Mätintervall för analysen

Proverna måste mätas i intervallet mellan den lägre detektionsgränsen och den högsta koncentrationen för kalibreringsintervallet.

11.2 Spårbarhet

P3NP-ELISA-setets tilldelade PIIINP-värden uttrycks i mikrogram per liter ($\mu\text{g/l}$) och är standardiserade på en intern standard skapad från prover från humanserum som är spårbara till en kvantitativ referensmetod.

11.3 Precision

11.3.1 Intraanalys

Intraanalysvariationen (inom körningarna) fastställdes genom 31 mätningar på 3 serumprover som täckte hela mätintervallet för kalibreringskurvan.

Inomkörningsprecision

Prov	1	2	3
n	31	31	31
Medelvärde ($\mu\text{g/l}$)	5,2	13,4	25,5
CV (%)	2,2	2,4	3,6

11.3.2 Interanalys

Interanalysvariationen (mellan körningarna) fastställdes med hjälp av 3 serumprover som mättes i 8 körningar i duplikat.

Mellankörningsprecision

Prov	1	2	3
n	8	8	8
Medelvärde ($\mu\text{g/l}$)	5,3	13,1	25,0
CV (%)	6,5	8,0	7,3

11.4 Detektionsgräns

- Detektionsgränsen (LOD eller analytisk känslighet) för P3NP-ELISA-setet definieras som lägsta spårbara koncentration som skiljer sig från noll med en sannolikhet på 95 %, beräknat genom att lägga till 2 standardavvikelser till genomsnittet för 30 replikatanalyser för nollkalibratören (KAL0).

Analytisk känslighet (detectionsgräns)

LOD 2σ	0,036 $\mu\text{g/l}$
---------------	-----------------------

- Kvantitetsgräns (LOQ eller funktionskänslighet) för P3NP-ELISA-setet definieras som koncentrationen som uppmättes med imprecisionsprofilen vid mellankörnings-CV motsvarande 12,5 %. Det utvärderades genom att 9 serumprover testades i duplikat i 8 körningar. Medel, standardavvikelse, och %CV fastställdes därefter för varje prov och en 3-parameters effektvariansfunktion användes för anpassning.

Funktionskänslighet (kvantitetsgräns)

LOQ 12,5 %CV	2,2 $\mu\text{g/l}$
--------------	---------------------

11.5 Antigenåterställning

PIIINP-lösningar från kalibratorerna 2 till 5 blandades 1:1 till 2 serumprovpooler med olika initiala PIIINP-koncentrationer. Varje prov (icke-höjning och höjning) analyserades i duplikat i en körning. PIIINP-koncentrationer uppmättes och de återställda procentandelarna beräknades.

Återställning

Prov	1	2
Koncentration (µg/l)	3,0	7,1
Medelåterställning (%)	91	95
Återställningsintervall (%)	88–92	92–97

11.6 Spädning – linearitet

Studier utfördes för att utvärdera analysens linearitet med hjälp av 4 serumprover av olika koncentrationer. Proverna analyserades outspädda och seriespända med DIL-KALO (spädningsfaktor ned till 1:16).

Spädning

Prov	3	4	5	6
Koncentration (µg/l)	27,7	22,1	24,1	24,5
Spädningsintervall	1:2 till 1:16	1:2 till 1:16	1:2 till 1:16	1:2 till 1:16
Medelåterställning (%)	101	104	99	102
Återställningsintervall (%)	94–107	100–109	96–101	100–104

Linearitet

Spärr	0,18	0,30	-0,11	0,13
Lutning (Y=uppmätt)	1,00	1,00	1,00	0,99
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99

Dessa resultat visar en god linearitet för spädningstestet över det rapporterade mätintervallet för denna analys.

11.7 Specificitet

Analysens specificitet garanteras med hjälp av två komplementära monoklonala antikroppar. De monoklonala antikropparna som användes i setet är specifika för N-terminal prokollagen III-peptid. PIIINP-peptiden kan degraderas genom proteolys i kol1-fragment som inte påvisas med P3NP-ELISA-setet.

11.8 Hook-effekt

Ingen hook-effekt observerades med denna analys, testad upp till 200 µg/l.

11.9 Interferens

En interferensstudie utvärderades enligt riktlinjen CLSI EP17-A2. Mätningar utfördes på 4–6 replikat med 2 provnivåer (låg och medel på standardkurvan). Icke-signifikant interferens definierades som en skillnad jämfört med kontroll (prov med icke-höjning) på inom ±10 %. Ingen interferens observerades när plasmaprover testades med någon av följande substanser:

- Triglycerider från hyper-lipidemisk EDTA-plasma (humant prov – totalt och halvt utspätt 743,4mg/dl TG)
- Triglycerider från en kommersiell intralipidlösning (30 mg/ml)
- Humant albumin (höjning upp till 60 mg/ml)
- Bilirubin (0,15 mg/ml)
- Humant hemoglobin (2 mg/ml)
- Metodextrat (2 mM)
- Gallsyror (upp till 35 µM)

OBS: Triton X-100 interfererade något (-14 % maximal avvikelse) med detta test när 0,1 % av denna substans tillsattes i proverna.

FÖRSIKTIGHET: immunanalysen skyddas mot potentiella interferenser med **heterofila antikroppar** såsom HAMA och reumatoida faktorer (RF) genom tillsatt skydd. Trots det kan vi inte garantera att det aldrig kommer att bli ett falskt positivt eller negativt resultat på grund av förekomst av heterofila antikroppar i ett patientprov.

12. FÖRVÄNTADE NORMALVÄRDEN

För att kunna avgöra det normala intervallet för P3NP-ELISA, analyserades 120-prover (plasma-EDTA) från förmodat friska donatorer med P3NP-ELISA-setet.

Resultaten visas i tabellen nedan i µg/l:

Förväntade normalvärden för P3NP-ELISA (µg/l PIIINP)

Medel	Median	5:e percentilen	95:e percentilen	Min.	Max.
4,9	4,6	2,9	8,1	2,1	13,1

Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sina egna normala värden. Nedan angivna värden är vägledande.

13. METODJÄMFÖRELSE

En studie utfördes för att jämföra resultaten för P3NP-ELISA-setet med RIA-gnost® PIIP (Cisbio Bioassays) med hjälp av 37 serumprover.

- Ekvivalensen för den koncentration som rapporterades av RIA-gnost® PIIP-analysen med hänsyn till µg/l-enheter erhöles genom att multiplicera resultaten från RIA-setet (E/ml) med faktor 8 för att erhålla µg/l enligt beskrivningen i RIA-gnost PIIP®-setets instruktioner.

En Passing-Bablok-regressionsanalys tillämpades på dessa prover, vilket gav följande ekvation:

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

Pearson-korrelationskoefficienten var $r = 0,962$

Konfidensintervallet på 95 % för lutningen var 0,81 till 1,04 och konfidensintervallet på 96 % för spärren var 0,41 till 2,00 µg/l för de 37 patientproverna med PIIINP-koncentrationer med ett intervall från 3,23 till 24,9 µg/l (som uppmättes med P3NP-ELISA-analysen).

- Utan att tillämpa en konversionsfaktor på RIA-gnost® PIIP-analysen erhöles följande ekvation:

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

Pearson-korrelationskoefficienten var $r = 0,962$

Konfidensintervallet på 95 % för lutningen var 6,89 till 8,66 och konfidensintervallet på 95 % för spärren var -0,04 till 1,66 µg/l för de 37 patientproverna med PIIINP-koncentrationer med ett intervall från 3,23 till 24,9 µg/l (som uppmättes med P3NP-ELISA-analysen)

14. LITTERATURFÖRTECKNING

1. Tanwar S, et al. *Hepatology*. 2013 Jan;57(1):103-11
2. Pathirana D, et al. *JEADV* 2009; 23 (Suppl. 2), 5-70.
3. Fernandes f. et al. *J Clin Gastroenterol* 2015;49:235–241
4. Safdar et al, *Int J Cardiovasc Res* 2015, 4:2

P3NP-ELISA



LABORATORIEPROTOKOLLKORT

Använd inte detta kort utan ha läst hela bipacksedeln.

☞ Om det är tillämpligt, späd proverna med de förmodade höga P3NP-koncentrationerna med spädningvätskan **DIL** **CALO**-reagens som medföljer setet.

1. SPÄD kalibratorer (1 ml) och kontroller (0,25 ml) med dH₂O **CAL** **CONTROL**

Obs: kalibratorerna är bruksfärdiga. Förspäd dem INTE

2. FÖRSPÄD prover och kontroller till 1:11 **DIL** **CALO** **SAMPLE** **CONTROL**

Preparera ett tillräckligt antal provrör för att utföra förspädning

↓ Fördela **300 µl** spädningvätska i varje rör.

↓ Tillsätt **30 µl** av varje prov eller kontroll i plaströren och blanda varsamt med blandare av vortextyp.

1:11 förspädning

3. TILLSÄTT PROVER PÅ MIKROPLATTAN **SAMPLE** **CAL** **CONTROL**

↓ Tillsätt **100 µl** av kalibratorerna, de förspädda kontrollerna och proverna till lämpliga brunnar i duplikat.

+ 100 µl



4. FÖRDELA KONJUGAT **CONJ**

↓ Fördela **100 µl** HRP-antikropps-konjugat i brunnar.

+ 100 µl



5. INKUBERA

Täck över med självhäftande film och inkubera i **3 tim.** i rumstemperatur (18–25 °C) under orbital skakning vid **700 varv/min.**

3 tim.



↕ **700**
varv/min.

6. TVÄTT (se 7.2.1) **WASH**

Preparera tvättlösning = 1 tablett + 100 ml dH₂O + 0,3 ml Tween20 per 100 ml.

Rengör brunnarna i **3 cykler** **Aspirera → Fördela 300 µl tvättlösning.**

Avsluta med aspiration. Den resterande lösningsvolymen måste vara så låg som möjligt. Det är möjligt att försiktigt slå på plattan upp och ned för att ta bort den kvarvarande vätskan.

3 x 300 µl



7. FÖRDELA SUBSTRAT **SUBS** **TMB**

↓ Fördela **100 µl** TMB-substrat i alla brunnar och starta den **15 min. långa** inkubationen efter fördelning i den första brunnen

+ 100 µl



8. INKUBERA

Täck över med självhäftande film och slutför inkuberingen på **15 min.** i rumstemperatur (18-25 °C) utan skakning. Inkubering i mörker är inte nödvändigt.

15 min.



9. FÖRDELA STOPPLÖSNING **STOP** **SOLN**

↓ Fördela **100 µl** STOPPlösning i alla brunnar

+ 100 µl



10. AVLÄS

☞ Utför en avläsning vid **450 nm** inom 30 min. – Använd en **4PL-anpassning** för datainterpolation

Valfritt: utför en avläsning vid en våglängd på 620 nm

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