



Gebrauchsanweisung

Gültig ab 04.10.2022

Anti-GP2 IgA

REF 3750

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgA
Antikörpern gegen Glycoprotein 2
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



1 Zweckbestimmung

Der Anti-GP2 IgA ist ein quantitativer Immunoassay zur Bestimmung von IgA Antikörpern gegen Glycoprotein 2 (GP2) in humanem Serum.

Der Anti-GP2 IgA dient zur Unterstützung bei der Diagnose von Morbus Crohn in Verbindung mit anderen klinischen und laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen.

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

2 Diagnostische Bedeutung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (Enteritis regionalis) oder Colitis ulcerosa sind durch unklare Ätiologie und chronisch-rezidivierende Entzündungsprozesse gekennzeichnet. Während bei der Colitis ulcerosa die Entzündung vor allem in der Mucosa und Submucosa des Colons und Rectums auftritt, sind beim Morbus Crohn wanddurchgreifende, granulomatöse Entzündungsprozesse des gesamten Gastrointestinaltraktes charakteristisch. Immunologische, infektiöse, genetische und Umweltfaktoren scheinen das Risiko für die Ausbildung dieser Erkrankungen zu erhöhen.

Die Differentialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen von anderen Erkrankungen wie chronische Diarrhoe, recurrentem abdominalem Schmerz, akuter infektiöser Colitis oder Anorexie sowie die Differentialdiagnose von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist eine klinische Herausforderung.

Autoantikörper des exocrinen Pankreas (PAB) wurden als spezifischer serologischer Marker für Morbus Crohn identifiziert. Mit einer Prävalenz von ca. 39 % konnten diese durch indirekte Immunfluoreszenz (IIF) in Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden (Stöcker et al. 1987). Glycoprotein 2

(GP2), ein membranständiges, glycolisiertes Protein des Pankreas konnte als Hauptantigen der PAB identifiziert werden (Roggenbuck et al., 2009). Zusammen mit den zirkulierenden Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) mit einer Prävalenz von 70 % bei Morbus Crohn und den atypischen antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (aANCA) - charakteristisch für Patienten mit Colitis ulcerosa - können die PAB's gegen GP2 zur Differentialdiagnose von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als hochspezifische Marker verwendet werden.

3 Testprinzip

Der ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ist ein immunologisches Verfahren zur Bestimmung spezifischer Antikörper. Die Streifen der Mikrotiterplatte sind mit testspezifischen Antigenen beschichtet. Sind Antikörper in der Patientenprobe vorhanden, binden sie an die Antigene. Ein mit Peroxidase markierter Sekundäntikörper detektiert den so gebildeten Immunkomplex. Ein farbloses Substrat wird in ein farbiges Produkt umgewandelt. Die Signalintensität des Reaktionsprodukts ist proportional zur Antikörperaktivität in der Probe. Nach Abstoppen wird die Signalintensität des Reaktionsprodukts photometrisch erfasst.

4 Testkomponenten

Komponente	Beschreibung
Mikrotiterplatte A Ag 96 1 Stück	12 brechbare Mikrotiterstreifen (gebrauchsfertig), 8 Kavitäten pro Streifen, jede Kavität ist mit rekombinantem, humanen Glycoprotein 2 beschichtet
Kalibrator 0 – 4 CAL 5 x 1 mL, weißer Deckel	Gefärbte Lösung mit humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950) Die Antikörperaktivitäten sind auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Negativkontrolle N CONTROL - 1 x 1 mL, grüner Deckel	Gefärbte Lösung mit humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950) Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Positivkontrolle P CONTROL + 1 x 1 mL, roter Deckel	Gefärbte Lösung mit humanem Serum (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950) Die Antikörperaktivität ist auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben.
Probenverdünner C DIL 1 x 100 mL, schwarzer Deckel	Gefärbte Lösung (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950)
Waschpuffer B BUF WASH 10x 1 x 100 mL, weißer Deckel	Konzentrierte Lösung (10x; enthält ProClin 950)
Konjugat IgA D CONJ 1 x 15 mL, violetter Deckel	Gefärbte Lösung mit polyklonalem anti-human IgA Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (gebrauchsfertig; enthält ProClin 950)
Substrat E SOLN TMB 1 x 15 mL, blauer Deckel	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (gebrauchsfertig)

Stopplösung F H₂SO₄ 0.25M 1 x 15 mL, gelber Deckel	0.25 M Schwefelsäure (gebrauchsfertig)
Adhäsionsfolie 2 Stück	-
Qualitätskontrollzertifikat 1 Stück	-
Gebrauchsanweisung 1 Stück	-

5 Zusätzlich benötigtes Material

- Übliche Laborausrüstung
- Präzisionspipetten (5 – 1000 µL), Multikanalpipetten (100 – 1000 µL) und Einwegpipettenspitzen
- Messzylinder (100 – 1000 mL)
- Probenröhrchen zur Herstellung von Verdünnungen
- Vortex Mixer oder anderer Rotator
- Mikrotiterplatten Washer oder Waschkamm
- Mikrotiterplatten Reader mit optischen Filtern für 450 nm und 620 nm oder 690 nm
- 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 to 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 Pipettiertechniken 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 Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatte ist in einem Aluminiumbeutel eingeschweißt. Unbenutzte Teststreifen sollten immer gekühlt und mit Trockenmittel vor Feuchtigkeit geschützt im gut verschlossenen Aluminiumbeutel gelagert werden. Sorgfältig verschlossen sind die Teststreifen 8 Wochen nach Anbruch verwendbar.

8.1.2 Kalibratoren

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Kalibratoren müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden.

8.1.3 Kontrollen

Positive und negative Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden. Kontrollen müssen in jedem Testansatz mitgeführt werden. Alternativ können Laboratorien auch eigene Kontrollen validieren und verwenden.

8.1.4 Probenverdünner

Der Probenverdünner ist gebrauchsfertig.

8.1.5 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.

8.1.6 Konjugat

Das Konjugat ist gebrauchsfertig und nach Anbruch und Lagerung bei 2 °C bis 8 °C 8 Wochen stabil.

8.1.7 Substrat

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

8.1.8 Stopplösung

Die Stopplösung ist gebrauchsfertig.

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 Probenverdünnung

Die Proben müssen 1:101 (z. B. 10 µL + 1000 µL in Probenverdünner verdünnt und gut durchmischt werden. Schaumbildung sollte vermieden werden.

8.2.3 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 Pipettierschema

Das folgende Pipettierschema wird empfohlen:

	1	2	3	4
A	CAL 0	Probe 2		
B	CAL 1	Probe 3		
C	CAL 2	Probe 4		
D	CAL 3	Probe 5		
E	CAL 4	...		
F	N	...		

G	P	...		
H	Probe 1	...		

9.2 Ablaufschema

Die angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten und starke Zeitverschiebungen beim Pipettieren von Proben und Reagenzien vermieden werden. Nach Zugabe der Reagenzien sollte die Mikrotiterplatte kurz geschüttelt werden.

Schritt	Beschreibung
1. Zugabe von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben	Zugabe von 100 µl gebrauchsfertigen Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben pro Kavität
2. Inkubation	Abdecken der Platte und Inkubation für 60 min bei RT
3. Waschzyklus	Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und 3x Waschen mit jeweils 300 µL Waschlösung pro Kavität mit mindestens 5 Sekunden Einwirkzeit; Platte auf Filterpapier ausklopfen, um Restfeuchtigkeit zu entfernen.
4. Zugabe des Konjugats	Zugabe von je 100 µL gebrauchsfertigem Konjugat pro Kavität
5. Inkubation	Abdecken der Platte und Inkubation für 30 min bei RT
6. Waschzyklus	Absaugen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und 3x Waschen mit jeweils 300 µL Waschlösung pro Kavität mit mindestens 5 Sek. Einwirkzeit; Platte auf Filterpapier ausklopfen, um Restfeuchtigkeit zu entfernen.
7. Zugabe des Substrats	Zugabe von je 100 µL gebrauchsfertigem Substrats pro Kavität
8. Inkubation	Abdecken der Platte und Inkubation für 15 min im Dunkeln bei RT
9. Zugabe der Stopplösung	Zugabe von je 100 µL gebrauchsfertiger Stopplösung pro Kavität
10. Analyse	Messung der optischen Dichte (OD) innerhalb von 30 min bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm oder 690 nm

9.3 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 einer internen Referenzprobe kalibriert. Quantitative Ergebnisse werden in U/mL angegeben.

10.2 Standardkurve

Zur Erstellung einer Standardkurve werden die optischen Signale (optische Dichte, OD) der Kalibratoren gegen ihre Antikörper-aktivitäten aufgetragen und mit Hilfe eines 4-Parameter-Logistik-Fits (4 PL) korreliert. Unter Verwendung der so generierten Standardkurve können Antikörperaktivitäten unbekannter Proben direkt aus ihren optischen Signalen abgeleitet werden.

10.3 Validitätskriterien

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

- OD CAL 0 < CAL 1 < CAL 2 < CAL 3 < CAL 4
- OD CAL 4 > 1.2
- Die Negativkontrolle muss negativ bewertet sein.
- Die Positivkontrolle muss positiv bewertet sein und im Gültigkeitsbereich liegen, der auf dem Qualitätskontrollzertifikat angegeben ist.

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

Die Referenzbereiche sind nachfolgend angegeben:

	Interpretation
Antikörperaktivität < 5 U/mL	negativ
Antikörperaktivität 5 – 10 U/mL	grenzwertig
Antikörperaktivität > 10 U/mL	positiv

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.

	Intraassay Präzision		Interassay Präzision	
	U/mL	VK (%)	U/mL	VK (%)
Probe 1	220,9	1,7	215,6	3,0
Probe 2	61,5	2,3	58,8	3,9
Probe 3	17,3	4,5	19,0	7,6

11.1.2 Messbereich

Im Rahmen umfangreicher Leistungsbewertungsstudie wurden die Genauigkeit, Richtigkeit, Präzision, Linearität und Wiederfindung im Messbereich zwischen dem LoQ und dem höchsten Kalibrator nachgewiesen. Proben mit Ergebnissen oberhalb des höchsten Kalibrators sollten mit >max angegeben werden. Proben, mit Ergebnissen unterhalb des LoQ, sollten mit <min angegeben werden. Patientenproben mit Messwerten oberhalb des höchsten Kalibrators können in einer höheren Verdünnung analysiert werden. Zur Quantifizierung sind die erhaltenen

Antikörperaktivitäten dann mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

11.2 Diagnostische Leistungsmerkmale

11.2.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des Immunoassays wurden durch die Analyse von 115 Serumproben von Patienten mit Morbus Crohn und 131 Serumproben unselektierter Blutspender bestimmt.

	Diagnostische Leistung
Sensitivität	13,9 %
Spezifität	> 99 %

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 (< 1,0 %) als Konservierungsmittel, können eine Sensibilisierung der Haut bewirken (H317) und dürfen nicht verschluckt werden oder mit Haut oder Schleimhaut in Berührung kommen (P280, P333+P313).

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

- Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, Jantschek G, Scriba PC: Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. Scand. J. Gastroenterol. Suppl.. 1987, 139, 41 – 52.
- Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Büttner T, Jungblut PR, Porstmann T, Laass MW, Henker J, Büning C, Feist E, Conrad K: Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. Gut, 2009, 58, 1620 – 8.
- Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, Reinhold D, Szymczak S, Rogler G, Klebl F, Franke A, Rieder F. Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. Inflamm. Bowel Dis. 2016, 22, 2648 – 57.

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
	Achtung
	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen
	Mikrotiterplatte
	Kalibrator
	Negativkontrolle
	Positivkontrolle
	Probenverdünner
	Konjugat
	Waschpuffer
	Substrat
	Stopplösung

16 Änderungen

Änderungen in vorliegender Gebrauchsanweisung	
Aktuelle Version	005/10.2022
Zusammenfassung der Änderungen	Redaktionelle Änderungen; das Symbol Achtung wurde zur Konformität mit der EU Verordnung 1272/2008 hinzugefügt