

MBL

CE

MESACUP ECP TEST

Cat. No. 7618E: 96 wells
Cat.No. 7618E: 96 puits
Art.-Nr. 7618E: 96 Auftragsstellen
Cat. No. 7618E: 96 pocillos
Cat. n. 7618E: 96 pozzetti
Cat. N° 7618E: 96 poços
Kat. Nr. 7618E: 96 brunnar
Ap. kat. 7618E: 96 βυθισμάτων
Kat. No. 7618E: 96 kuyucuk

FOR PROFESSIONAL USE ONLY
UNIQUEMENT À USAGE PROFESSIONNEL
NUR ZUM PROFESSIONELLEN GEBRAUCH
SOLO PARA USO PROFESIONAL
SOLO PER USO PROFESSIONALE
APENAS PARA USO PROFISSIONAL
ENDAST FÖR PROFESSIONELLT BRUK
МОНО ΓΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
SADECE PROFESYONEL AMAÇLI KULLANIM İÇİNDİR

MBL MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

KDX Nagoya Sakae Bldg. 10F

4-5-3 Sakae, Naka-Ku, Nagoya, Aichi, 460-0008 Japan

Tel: +81 52-238-1901 Fax : +81 52-238-1440 URL <http://www.mbl.co.jp>

- CONTENTS -
- CONTENU -
- INHALTSVERZEICHNIS -
- CONTENIDO -
- CONTENUTI -
- CONTENDO -
- INNEHÅLL -
- ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ –
- İÇİNDEKİLER –

English	1
Français	8
Deutsch	15
Español	22
Italiano	29
Português	
Svenska	
Ελληνικά	
Türkçe	36

Symbols/Symboles/Symbole/Símbolos/Simboli/ Simbolos/Symboler/Σύμβολα/Semboller	43
---	----

English

INTENDED USE

The MESACUP ECP TEST is quantitative assay kit for human ECP in serum by sandwich ELISA.
The MESACUP ECP TEST is intended for in vitro diagnostic use.

SUMMARY AND EXPLANATION

Eosinophil Cationic protein (ECP), Eosinophil derived Neurotoxin (EDN) and Major Basic Protein (MBP) are known to be major protein-mediators derived from activated eosinophils. ECP and EDN are found in matrix of granules in eosinophils whereas MBP is found in core of granules. ECP and EDN are members of the ribonuclease A superfamily. ECP and MBP have high cytotoxicity. Activated eosinophile play an important role in the late asthmatic response and in the asthmatic airway inflammation. As ECP is secreted from activated eosinophils, ECP can be a marker of eosinophile activation and degranulation.

The MESACUP ECP TEST is for measuring ECP specifically with high sensitivity by ELISA.

PRINCIPLE

The MESACUP ECP TEST measures human ECP by sandwich ELISA.

In the wells coated with anti-human ECP monoclonal antibody, samples to be measured or standards are incubated. After washing, a peroxidase conjugated anti-human ECP polyclonal antibody is added into the microwells and incubated. After another washing, the peroxidase substrate is added into microwells and incubated for an additional period of time. An acid solution is then added to each well to terminate the enzyme reaction and to stabilize the developed color. The optical density (O.D.) of each well is then measured at 450 nm using a microplate reader. The concentration of ECP is calibrated from a standard curve based on reference standards.

BRIEF ASSAY PROCEDURE

<Sample Incubation>	Add 100 µL of diluted sample (1:5) to each well of the microwell plate.
(20~25°C) 60 min.	↓
<Wash>	Wash
	↓
<Conjugate Incubation>	Add 100 µL of Conjugate Reagent to each well.
(20~25°C) 60 min.	↓
<Wash>	Wash
	↓
<Substrate Incubation>	Add 100 µL of Substrate to each well.
(20~25°C) 10 min.	↓
<Stop Reaction>	Add 100 µL of Stop Solution to each well.
	↓
	Read Absorbance at 450 nm
	↓
	Interpretation of Result

REAGENTS AND STORAGE

Materials	Quantity (96 wells)
Microwell Strips coated with anti-human ECP antibody	8-well x 12 strips
ECP Standard 0.09% sodium azide, 1% Goat Serum Ready-to-use	1.3 mL x 6 vials
Assay Diluent 0.09% sodium azide, 1% Goat serum Ready-to-use	50 mL x 1 vial
Conjugate Reagent (Horseradish Peroxidase conjugated anti-human ECP polyclonal antibody) 1% BSA Ready-to-use	15 mL x 1 vial
Wash Concentrate (20 x concentrated solution)	100 mL x 1 vial
Substrate TMB/H ₂ O ₂ Ready-to-use	20 mL x 1 vial
Stop Solution 0.5 mol/L H ₂ SO ₄ Ready-to-use	20 mL x 1 vial
Positive Control 0.09% sodium azide, 1% Goat Serum	1.3 mL x 1 vial
Negative Control 0.09% sodium azide, 1% Goat Serum	1.3 mL x 1 vial

Both unopened and first opened kit components are stable until the labeled expiration date at 2-8°C.

PRECAUTIONS

- (1) This product is for in vitro diagnostic use only. Do not use in human beings.
- (2) Do not use the kit components beyond the stated expiration dates.
- (3) Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- (4) Avoid contact of the reagents with eyes, skin and clothing. Reagents on skin must be washed away with plenty of water. TMB is irritating and the Stop Solution consists of 0.5 mol/L sulfuric acid, which is a poison and is corrosive.
- (5) ECP Standard, Assay Diluent, Positive Control and Negative Control contain sodium azide (0.09%) as a preservative and must be handled with caution. Do not ingest or allow contact with skin or mucous membranes. Sodium azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azides. Therefore, always flush with plenty of water when disposing materials containing sodium azide into a drain.
- (6) ECP Standard, Assay Diluent, Conjugate Reagent, Positive Control and Negative Control contain materials of animal origin, taken from non-infected animals. These components, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- (7) Do not mix reagents from other kits.
- (8) All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) before starting the assay.

- (9) Do not expose the kit to direct sun during the test and storage.
- (10) Avoid microbial and cross contamination of reagents or samples.

Contamination of the TMB substrate solution with conjugate or other oxidants will cause the solution to change color prematurely.
- (11) Incubation temperatures above or below normal room temperature (20-25°C), shorter or longer incubation times and inaccurate dilutions may give erroneous results.
- (12) The wells must be properly rinsed with Wash solution to avoid false positive results.
- (13) Carefully pipette each sample and reagent to avoid cross contamination between microwells, avoid foaming.
- (14) All unused Microwell Strips should be returned to the ziplock pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.

Do not allow wells to become dry during an assay procedure.
- (15) Wash Concentrate may become turbid at 2-8°C, this does not cause inconsistent results.

Dissolve the Wash Concentrate completely when preparing the Wash Solution.
- (16) Materials used for the test should be disposed or treated as shown below.

Soak in 2% final conc. glutaraldehyde solution for more than 1 hour, soak in 0.1% sodium hypochlorite solution (available chlorine: approx. 1,000 ppm) for more than 1 hour or autoclave at 121°C for more than 20 minutes.
- (17) The results obtained from this assay are aids in the diagnosis only. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedure.
- (18) In the event of damage to the protective packaging, the kit components should be treated or disposed of in accordance with the relevant instructions and regulations of each country.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader (wavelength: 450 nm, 620 nm/reference)
- Multichannel micropipette (e.g. 100 µL - 300 µL)
- Single channel pipette (e.g. 10 µL & 100 µL)
- Autowasher or washing bottle
- Deionized or distilled water
- One liter graduated cylinder for preparation of Wash Solution
- Test tubes for patient sample dilutions (e.g. 1,000 µL)
- Disposable pipette tips
- Paper towels
- Microplate cover

PROCEDURE

■ PREPARATION OF REAGENTS

- 1) Bring all assay materials to room temperature (20-25 °C) prior to use.
- 2) Microwell Strips: Remove required Microwell Strips from the pouch and place them in the frame. Promptly return unused strips to refrigerated storage.
- 3) Wash Solution: The Wash Concentrate must be diluted prior to use. Dilute the Wash Concentrate 1: 10 by adding 100 mL of the concentrate to 900 mL of distilled water. The diluted Wash Solution is

stable for 2 weeks at 2-8 °C

4) Do not dilute ECP Standard, Assay Diluent, Conjugate Reagent, Substrate and Stop Solution. These reagents are ready- to-use.

■ PREPARATION OF CONTROLS

Dilution of controls

Dilute Positive Control and Negative Control 1:5 with Assay Diluent.

For example, by adding 50 µL of control to 200 µL of Assay Diluent.

* Dilute controls for each assay because they cannot be stored.

■ PREPARATION OF SAMPLES

1) Sampling

Serum levels of ECP can be varied by *in vitro* effect after sampling. There is a possibility that *in vitro* release of ECP from eosinophils can occur during coagulation. Therefore, each laboratory is recommended to establish its own sampling procedure. The following sampling procedure has been reported.

Blood for measurement of ECP was collected in Vacutainer SST tube (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J., USA). The blood allowed to clot at room temperature for exactly 60 minutes. Thereafter, the serum was separated by centrifugation for 10 minutes at 1200 x g, and then transferred to a new test tube and stored at -20 °C until the analyses were performed.

2) Dilution of sample (Human serum)

Dilute each sample 1:5 with Assay Diluent.

For example, by adding 50 µL of sample to 200 µL of Assay Diluent.

* Dilute samples for each assay because they cannot be stored.

3) Storage

Use fresh patient sera. Samples should be tested as soon as possible after collection.

If storage is needed, samples should be stored at -20°C or lower. Do not repeat freezing and thawing.

■ ASSAY PROCEDURE

STEP 1. (SAMPLE INCUBATION)

Transfer 100 µL of ECP Standard, each diluted sample, Positive Control and Negative Control, with a multichannel micropipette, into the appropriate microwells. (Do not dilute ECP Standard.)

* Incubation starts on pipetting into the microwells. Pipetting should be completed as quickly as possible.

Cover the wells with a microplate cover and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 2. (WASHING)

Aspirate or discard the well contents. Fill the well with Wash Solution and then completely aspirate or discard the contents. Wash 4 times. Tap the plate on a paper towel to remove any remaining Wash Solution. When autowasher is used, wash 4 times.

* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and other conditions.

* Wash Solution should be used at 20-25°C.

STEP 3. (CONJUGATE INCUBATION)

Add 100 µL of the Conjugate Reagent to each well with a multichannel micropipette.
Cover the wells with the microplate cover and incubate for 60 minutes at room temperature (20-25°C).

* Do not return the Conjugate Reagent once taken out of vial.

STEP 4. (WASHING)

Wash the microplate as described in STEP 2.

STEP 5. (SUBSTRATE INCUBATION)

Add 100 µL of the Substrate to each well with a multichannel micropipette.

* Do not return the Substrate once taken out of vial.

Cover the wells with the microplate cover and incubate for 10 minutes at room temperature (20-25°C).

STEP 6. (STOPPING REACTION)

Add 100 µL of the Stop Solution to each well with a multichannel micropipette.

■ READING

Read the absorbance of each well at 450 nm. If a dual wavelength plate reader is used, set the test wavelength at 450 nm and the reference at 620 nm.

* Reading should be done within 20 minutes after stopping the reaction.

* Before reading the plate, ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells.

■ CALCULATION OF RESULTS

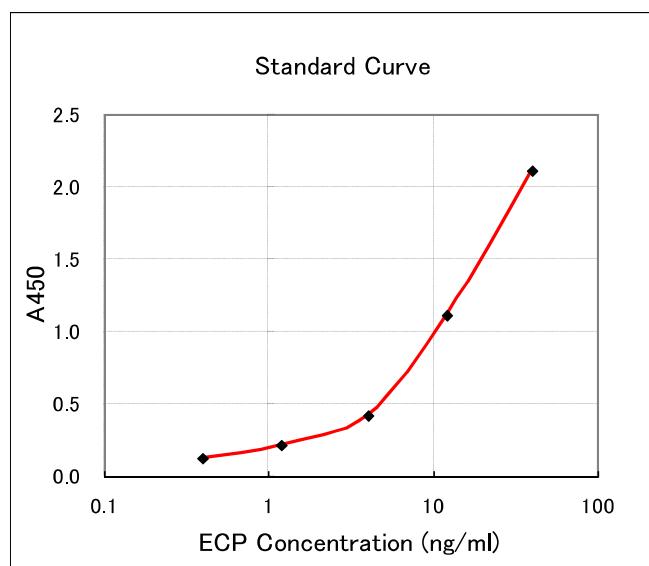
Calculate the mean absorbance value of each standard and plot against log standard concentration on suitable graph paper. The concentrations of the samples can then be read from the standard curve.

If using a program to automatically calculate the concentration, it is recommended that the best fitting curve is used.

Report the ECP concentration of samples by multiplying the value read from the standard curve by dilution factor (e.g. x 5).

*An international reference material for ECP is not available. ECP was purified and measured its protein concentration by Ultraviolet absorbance method and protein measurement method.

■ EXAMPLE OF STANDARD CURVE



■ QUALITY CONTROL

Each assay result should meet the following criteria.

A₄₅₀ of ECP Standard 1: ≤ 0.2

A₄₅₀ of ECP Standard 6: ≥ 1.2

The Positive and Negative Controls must give the following results:

ECP Value (ng/mL): As described in each label.

If any of these are not met, the results are invalid and the test should be repeated.

Before repeating assay, check the following procedure.

- Incubation Temperature
- Incubation Time
- Washing

■ CONCENTRATION OF HUMAN ECP IN NORMAL HUMAN SERUM.

Serum sample from healthy blood donors were assayed by the MESACUP ECP TEST.

148 healthy donor sera were measured. After removing those samples measuring over the mean + 3SD, the new mean + 3SD was determined to be: mean + 3SD = 15.6 ng/mL.

Sample n = 148 mean = 4.06 ng/mL SD = 3.86 mean+3SD = 15.6 ng/mL

■ LIMITATIONS

As with other diagnostic test procedures, the results obtained with the MESACUP ECP TEST serve only as an aid in the diagnosis and should not be interpreted as diagnostics in themselves.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

■ SENSITIVITY

A₄₅₀ of ECP Standard 1 (0 ng/mL) shall be \leq 0.2

A₄₅₀ of ECP Standard 6 (40 ng/mL) shall be \geq 1.2

■ SPECIFICITY

When measuring control samples of known concentrations, each value shall be within $\pm 20\%$ of known concentration.

■ REPRODUCIBILITY

When measuring 3 control samples of known concentrations eightfold simultaneously, CV% of each sample shall be within 15%.

■ INTERFERING SUBSTANCES

Bilirubin F (up to 18.3 mg/dL), Bilirubin C (up to 19.0 mg/dL), Chyle (up to 1,390 unit as Formazine) and /or Rheumatoid factor (up to 500 IU/mL) are not affective on the assay result, but avoid using highly lipemic samples.

Hemoglobin does affect the assay results. Do not use hemolysed samples.

No effect was found to assay values in adding up to 500 ng/mL of EDN.

■ ASSAY RANGE

The assay range of this kit is from 0.125 ng/mL to 40 ng/mL.

REFERENCES

1. Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150 (1986)
2. Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
3. Peterson, C., et al., Eur. J Haematol., 40, 415-423 (1988)
4. Zimmerman, B., et al., Clin Exp Allergy, 23, 564-570 (1993)

Français

BUT DU DOSAGE

Le MESACUP ECP TEST est un dosage quantitatif de l'ECP humaine dans le sérum par ELISA en sandwich.

Le MESACUP ECP TEST est destiné au diagnostic in vitro.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La protéine éosinophile cationique (ECP), la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN) et la protéine basique majeure (MBP) sont des médiateurs protéiques importants dérivés d'éosinophiles activés. L'ECP et l'EDN se trouvent dans la matrice des granules des éosinophiles tandis que la MBP se trouve dans le cristalloïde (core) des granules. L'ECP et l'EDN appartiennent à la super-famille de la ribonucléase A. L'ECP et la MBP ont une cytotoxicité élevée. Des éosinophiles activés jouent un rôle important dans la réponse asthmatique tardive et dans l'inflammation asthmatique des voies respiratoires. L'ECP étant secrétée par les éosinophiles activés, elle peut être un marqueur d'activation et de dégranulation des éosinophiles.

Le MESACUP ECP TEST permet de détecter spécifiquement l'ECP par ELISA avec une sensibilité élevée.

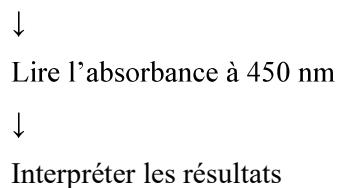
PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le MESACUP ECP TEST mesure l'ECP humaine par ELISA en sandwich.

Les échantillons qui doivent être mesurés ou les calibrateurs sont incubés dans les puits tapissés d'anticorps monoclonaux anti-ECP humaine. Après un lavage, des anticorps polyclonaux anti-ECP humaine conjugués à la peroxydase sont ajoutés aux puits de microtitration et incubés. Après un autre lavage, le substrat de la peroxydase est ajouté dans les puits de microtitration et incubé une nouvelle fois. Une solution acide est ensuite ajoutée à chacun des puits afin d'arrêter la réaction enzymatique et de stabiliser la couleur développée. La densité optique (O.D.) de chacun des puits est alors mesurée à 450 nm avec un lecteur de micro plaque. La concentration en ECP est calibrée à partir d'une courbe de calibration basée sur des calibrateurs de référence.

PROTOCOLE SIMPLIFIÉ

<Incubation de l'échantillon>	Ajouter 100 µL d'échantillon dilué (1:5) à chacun des puits de la Micro plaque
(20~25°C) 60 min.	↓
	Laver
	↓
<Incubation du conjugué>	Ajouter 100 µL de Conjugué à chacun des puits
(20~25°C) 60 min.	↓
	Laver
	↓
<Incubation du substrat>	Ajouter 100 µL de Substrat à chacun des puits
(20~25°C) 10 min.	↓
<Arrêt de la réaction>	Ajouter 100 µL de Solution d'arrêt à chacun des puits



RÉACTIFS ET CONSERVATION

Matériel	Quantité (96 puits)
Barrettes de puits de microtitration tapissés par des anticorps anti- ECP humaine	8 puits de microtitration x 12 barrettes
Calibrateur ECP 0,09% d'azoture de sodium, 1% de Sérum de chèvre Prêt à l'emploi	1,3 mL x 6 flacons
Diluant sérum 0,09% d'azoture de sodium, 1% de Sérum de chèvre Prêt à l'emploi	50 mL x 1 flacon
Conjugué (anticorps polyclonal anti-ECP humaine conjugué à de la peroxydase de raifort) 1% de séralbumine bovine (BSA) Prêt à l'emploi	15 mL x 1 flacon
Solution de lavage (solution concentrée 20 x)	100 mL x 1 flacon
Substrat TMB/H ₂ O ₂ Prêt à l'emploi	20 mL x 1 flacon
Solution d'arrêt H ₂ SO ₄ 0,5 mol/L Prêt à l'emploi	20 mL x 1 flacon
Contrôle positif 0,09% d'azoture de sodium, 1% de sérum de chèvre	1,3 mL x 1 flacon
Contrôle négatif 0,09% d'azoture de sodium, 1% de sérum de chèvre	1,3 mL x 1 flacon

Les composants des trousse non ouvertes et ouvertes pour la première fois sont stables entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette.

PRÉCAUTIONS

- (1) Ce produit ne peut être utilisé que pour le diagnostic in vitro. Ne pas utiliser chez l'homme.
- (2) Ne pas utiliser les composants de la trousse après les dates de péremption indiquées.
- (3) Porter des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et la réalisation de l'essai. Bien se laver les mains lorsque l'analyse est terminée.
- (4) Éviter le contact des réactifs avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact des réactifs avec la peau, laver avec beaucoup d'eau. Le TMB est irritant et la Solution d'arrêt est de l'acide sulfurique à 0,5 mol/L qui est un poison et corrosif.
- (5) Le Calibrateur ECP, le Diluant sérum, le Contrôle positif et le Contrôle négatif contiennent de l'azoture de sodium (0,09%) comme agent conservateur. Ils doivent être manipulés avec précaution. Ne pas ingérer ni mettre en contact avec la peau ou les muqueuses. L'azoture de sodium peut réagir avec le cuivre ou le plomb des tuyauteries et former des azotures métalliques explosifs. C'est pourquoi il faut toujours rincer abondamment à l'eau lorsque l'on jette dans les canalisations des

substances contenant de l'azoture de sodium.

- (6) Le Calibrateur ECP, le Diluant sérum, le Conjugué, le Contrôle positif et le Contrôle négatif contiennent des substances d'origine animale prélevées sur des animaux non infectés. Ces composants doivent cependant être manipulés et jetés comme des dangers biologiques potentiels.
- (7) Ne pas mélanger avec des réactifs d'autres trousse.
- (8) Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (20-25°C) avant le lancement de l'essai.
- (9) Ne pas exposer la trousse aux rayons directs du soleil pendant l'analyse et lors du stockage.
- (10) Éviter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs ou des échantillons.
La contamination de la solution du substrat TMB avec le Conjugué ou d'autres oxydants provoquera un changement prématûr de la coloration de la solution.
- (11) Des températures d'incubation supérieures ou inférieures à la température ambiante normale (20-25°C), des temps d'incubation plus longs ou plus courts et des dilutions incorrectes peuvent affecter les résultats.
- (12) Les puits doivent être correctement rincés avec la Solution de lavage pour éviter des résultats faussement positifs.
- (13) Pipeter soigneusement chacun des échantillons et chacun des réactifs pour éviter la contamination croisée entre les puits de microtitration. Éviter la formation de mousse.
- (14) Toutes les barrettes de puits de microtitration non utilisées doivent être remises dans la pochette à glissière qui doit être soigneusement rescellée pour éviter l'absorption d'humidité.
Ne pas permettre l'humidification des puits pendant la procédure d'analyse.
- (15) La Solution de lavage (10x) peut devenir trouble entre 2 et 8°C. Cela n'affecte pas les résultats.
Dissoudre complètement la Solution de lavage (10x) lors de la préparation de la Solution de lavage.
- (16) Les substances utilisées pour l'analyse doivent être jetées et traitées comme décrit ci-dessous.
Faire tremper dans une solution de glutaraldéhyde à une concentration finale de 2% pendant plus d'une heure, faire tremper dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,1% (chlore disponible: approximativement 1.000 ppm) pendant plus d'une heure ou autoclaver à 121°C pendant plus de 20 minutes.
- (17) Les résultats obtenus par cet essai ne sont qu'une aide au diagnostic. Le médecin doit interpréter ces résultats à la lumière des antécédents du patient, de l'examen physique et d'autres procédures de diagnostic.
- (18) Si l'emballage protecteur est abîmé, les composants de la trousse doivent être traités ou jetés selon les instructions pertinentes et les réglementations de chacun des pays.

MATÉRIELS REQUIS, MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de micro plaque (longueur d'onde: 450 nm, 620 nm pour la référence)
- Micropipette multicanaux (par ex. 100 µL - 300 µL)
- Pipettes simple canal (par ex. 10 µL & 100 µL)
- Automate de lavage ou bouteille de lavage
- Eau distillée ou désionisée

- Un cylindre gradué d'un litre pour la préparation de la Solution de lavage
- Tubes d'analyse pour les dilutions des échantillons de patient (par ex. 1.000 µL)
- Pointes de pipettes jetables
- Serviettes en papier
- Couvercle de micro plaque

PROCÉDURE

■ PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- 1) Amener tous le matériel de l'essai à température ambiante (20-25°C) avant utilisation.
- 2) Micro plaque: retirer de la pochette les barrettes de puits de microtitration requises et les placer dans le porte-barrettes. Remettre rapidement les barrettes non utilisées dans le réfrigérateur.
- 3) Solution de lavage: la Solution de lavage (10x) doit être dilué avant utilisation. Diluer la Solution de lavage (10x) 1:10 en ajoutant 100 mL de la Solution de lavage (10x) à 900 mL d'eau distillée. La Solution de lavage diluée est stable pendant 2 semaines entre 2 et 8°C.
- 4) Ne pas diluer le Calibrateur ECP, le Diluant sérum, le Conjugué, le Substrat et la Solution d'arrêt. Ces réactifs sont prêts à l'emploi.

■ PRÉPARATION DES CONTRÔLES

Dilution des Contrôles

Diluer le Contrôle positif et le Contrôle négatif à 1:5 avec le Diluant sérum.
Par exemple, en ajoutant 50 µL de Contrôle à 200 µL de Diluant sérum.

* Diluer les Contrôles pour chacune des analyses car ils ne peuvent être conservés.

■ PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1) Échantillonnage

Les taux en ECP dans le sérum peuvent varier après l'échantillonnage par un effet *in vitro*. Il est possible qu'il y ait une libération *in vitro* d'ECP à partir des éosinophiles lors de la coagulation. C'est pourquoi il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre procédure d'échantillonnage. La procédure d'échantillonnage suivante a été effectuée.

Le sang pour la mesure de l'ECP a été collecté dans un tube Vacutainer SST (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J., USA). Le sang a pu coaguler à température ambiante pendant exactement 60 minutes. Après, le sérum a été séparé par centrifugation pendant 10 minutes à 1200 x g et puis a été transféré dans un nouveau tube à essai et gardé à -20°C jusqu'à ce que les analyses soient effectuées.

2) Dilution de l'échantillon (sérum humain)

Diluer chacun des échantillons à 1:5 avec le Diluant sérum.
Par exemple, en ajoutant 50 µL de l'échantillon à 200 µL de Diluant sérum.

* Diluer les échantillons pour chacune des analyses car ils ne peuvent être conservés.

3) Conservation

Utiliser des sérum frais. Les échantillons doivent être analysés aussi rapidement que possible après le prélèvement.

Si les échantillons doivent être conservés, ils doivent l'être à -20°C ou plus bas. Ne pas répéter des cycles de congélation et de décongélation.

■ PROCÉDURE DE L'ESSAI

ÉTAPE 1. (INCUBATION DE L'ÉCHANTILLON)

Avec une pipette multicanaux, transférer 100 µL de Calibrateur ECP, de chacun des sérum dilués, du Contrôle positif et du Contrôle négatif dans les puits appropriés de la micro plaque. (Ne pas diluer le Calibrateur ECP.)

* L'incubation démarre au moment du pipetage dans les puits de microtitration. Le pipetage doit être achevé le plus rapidement possible.

Recouvrir les puits avec un couvercle de micro plaque et incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20-25°C).

ÉTAPE 2. (LAVAGE)

Aspirer et jeter le contenu des puits. Remplir les puits de Solution de lavage et, ensuite, les aspirer complètement ou jeter le contenu. Laver 4 fois. Tapoter la plaque sur une serviette en papier pour retirer toute Solution de lavage restante. Lorsqu'un automate de lavage est utilisé, laver 4 fois.

* Il est recommandé que chaque laboratoire confirme ces propres temps de lavage appropriés et d'autres conditions.

* La Solution de lavage doit être utilisée entre 20 et 25°C.

ÉTAPE 3. (INCUBATION DU CONJUGUÉ)

Ajouter 100 µL de Conjugué à chacun des puits avec une pipette multicanaux.

Recouvrir les puits d'un couvercle de micro plaque et incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20-25°C).

* Ne pas remettre le Conjugué dans le flacon une fois qu'il a été prélevé.

ÉTAPE 4. (LAVAGE)

Laver la micro plaque comme décrit à l'ÉTAPE 2.

ÉTAPE 5. (INCUBATION DU SUBSTRAT)

Ajouter 100 µL de Substrat à chacun des puits avec une pipette multicanaux.

* Ne pas remettre le Substrat dans le flacon une fois qu'il a été prélevé.

Recouvrir les puits d'un couvercle de micro plaque et incuber pendant 10 minutes à température ambiante (20-25°C).

ÉTAPE 6. (RÉACTION D'ARRÊT)

Ajouter 100 µL de Solution d'arrêt à chacun des puits avec une pipette multicanaux.

■ LECTURE

Lire l'absorbance de chacun des puits à 450 nm. Si l'on utilise un lecteur de plaques à deux longueurs d'onde, régler la longueur d'onde d'analyse à 450 nm et la référence à 620 nm.

* La lecture doit se faire dans les 20 minutes après la réaction d'arrêt.

* Avant de lire la plaque, s'assurer que le fond de la plaque est propre et sec et qu'il n'y a pas de bulles d'air à la surface du liquide dans les puits.

■ CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer la valeur d'absorbance moyenne de chacun des calibrateurs et la reporter en fonction du logarithme de la concentration sur un papier semi-logarithmique. Les concentrations des échantillons

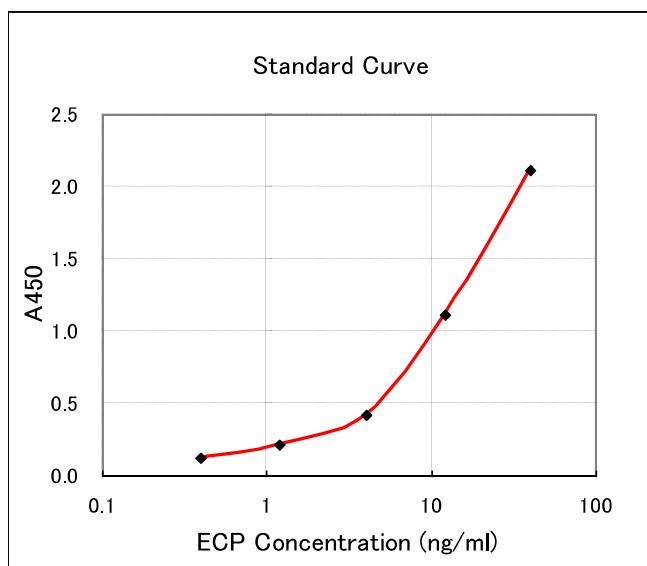
peuvent alors être lues sur la courbe de calibration.

Si un programme pour calculer automatiquement la concentration est utilisé, il est recommandé d'utiliser la courbe mieux ajustée.

Reporter la concentration en ECP des échantillons en multipliant la valeur lue sur la courbe de calibration par le facteur de dilution (par exemple x 5).

* Il n'y a pas de matériel de référence international pour l'ECP. L'ECP a été purifiée et sa concentration a été mesurée avec une méthode d'absorption dans l'ultraviolet et une méthode de mesure des protéines.

■ EXEMPLE D'UNE COURBE DE CALIBRATION



■ CONTRÔLE DE QUALITÉ

Chacun des résultats de l'essai doit rencontrer les critères suivants:

A₄₅₀ du Calibrateur ECP 1 : $\leq 0,2$

A₄₅₀ du Calibrateur ECP 6: $\geq 1,2$

Les Contrôles positif et négatif doivent donner les résultats suivants:

Valeur de l'ECP (ng/mL) : comme décrit sur les étiquettes.

Si une de ces conditions n'est pas remplie, les résultats sont non valables et l'analyse doit être répétée.

Avant de répéter l'analyse, vérifier la procédure suivante.

- Température d'incubation
- Temps d'incubation
- Lavage

■ CONCENTRATION DE L'ECP HUMAINE DANS LE SÉRUM HUMAIN NORMAL

Des échantillons de sérum de donneurs de sang sains ont été analysés avec le MESACUP ECP TEST.

148 sérums de donneurs sains ont été analysés. Après avoir retiré les échantillons mesurés au-delà de la moyenne + 3DS, la nouvelle moyenne + 3DS a été déterminée comme étant: moyenne + 3DS =

15,6 ng/mL.

Échantillon n = 148 moyenne = 4,06 ng/mL DS = 3,86 moyenne+3DS = 15,6 ng/mL

■ LIMITES

Comme pour d'autres procédures d'analyses de diagnostic, les résultats obtenus avec le MESACUP ECP TEST ne servent que comme aide au diagnostic et ne doivent pas être interprétés comme diagnostics en eux-mêmes.

PERFORMANCE

■ SENSIBILITÉ

A₄₅₀ du Calibrateur ECP 1 (0 ng/mL) doit être \leq 0,2

A₄₅₀ du Calibrateur ECP 6 (40 ng/mL) doit être \geq 1,2

■ SPÉCIFICITÉ

Lorsque des échantillons de contrôle de concentrations connues sont mesurés, chacune des valeurs doit se trouver dans $\pm 20\%$ de la concentration connue.

■ REPRODUCTIBILITÉ

Lorsque 3 échantillons de contrôle de concentrations connues sont mesurés huit fois simultanément, le CV% de chacun des échantillons doit être inférieur à 15%.

■ SUBSTANCES INTERFÉRENTES

La bilirubine F (jusqu'à 18,3 mg/dL), la bilirubine C (jusqu'à 19,0 mg/dL), la turbidité (jusqu'à 1.390 unités avec la formazine comme étalon) et/ou le facteur rhumatoïde (jusqu'à 500 UI/mL) n'affectent pas les résultats de l'analyse, mais éviter d'utiliser des échantillons fortement lipémiques.

L'hémoglobine affecte les résultats de l'analyse. Ne pas utiliser des échantillons hémolysés.

Aucun effet sur les valeurs de l'analyse n'a été constaté après avoir ajouté jusqu'à 500 ng/mL d'EDN.

■ FOURCHETTE DE L'ANALYSE

La fourchette de cette trousse va de 0,125 ng/mL à 40 ng/mL.

BIBLIOGRAPHIE

1. Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150 (1986)
2. Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
3. Peterson, C., et al., Eur. J Haematol., 40, 415-423 (1988)
4. Zimmerman, B., et al., Clin Exp Allergy, 23, 564-570 (1993)

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Der MESACUP ECP TEST ist ein quantitativer Sandwich ELISA zur Bestimmung von ECP in menschlichem Serum.

Der MESACUP ECP TEST ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die eosinophilen Granulaproteine: Eosinophiles Cationisches Protein (ECP), Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN) und das Major Basic Protein (MBP) sind wichtige Proteinmediatoren aktivierter eosinphiler Granulozyten. ECP und EDN kommen in der Matrix der Granula eosinophiler Zellen vor, während MBP im Kern der Granula zu finden ist. ECP und EDN sind Mitglieder der Ribonuclease A Superfamilie. ECP und MBP sind äußerst zytotoxisch. Aktivierte eosinophile Zellen spielen eine wichtige Rolle im späten Verlauf eines Asthmaanfalls und bei der durch Asthma bedingten entzündlichen Reaktion der Atemwege. Da ECP von aktivierten eosinophilen Zellen freigesetzt wird, kommt es als Marker der Aktivierung und Degranulierung eosinphiler Zellen in Frage.

“MESACUP ECP TEST” dient der spezifischen und hoch sensitiven Bestimmung von ECP im ELISA.

TESTPRINZIP

Der MBL MESACUP ECP TEST bestimmt menschliches ECP durch einen Sandwich ELISA.

Die Standards und Patientenserien werden in mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliches ECP beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein Waschschnitt. Danach werden mit Meerrettichperoxidase markierte polyklonale Antikörper gegen menschliches ECP den Vertiefungen hinzugefügt und inkubiert. Anschließend erfolgt ein weiterer Waschschnitt und dann wird Peroxidasesubstrat gemischt mit Chromogen zugegeben und inkubiert. Um die Enzymreaktion zu stoppen und die Farbentwicklung zu stabilisieren wird Säure in die Vertiefungen gegeben. Mit einem Mikrotiterplatten Reader werden die Vertiefungen bei 450 nm abgelesen und die ECP-Konzentration anhand einer Standardkurve, die auf Referenzstandards beruht, ermittelt.

KURZFASSUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

<Probeninkubation> 100 µL verdünnte Probe (1:5) zu jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte hinzufügen

60 Min. (20~25 °C) ↓

Waschen

↓

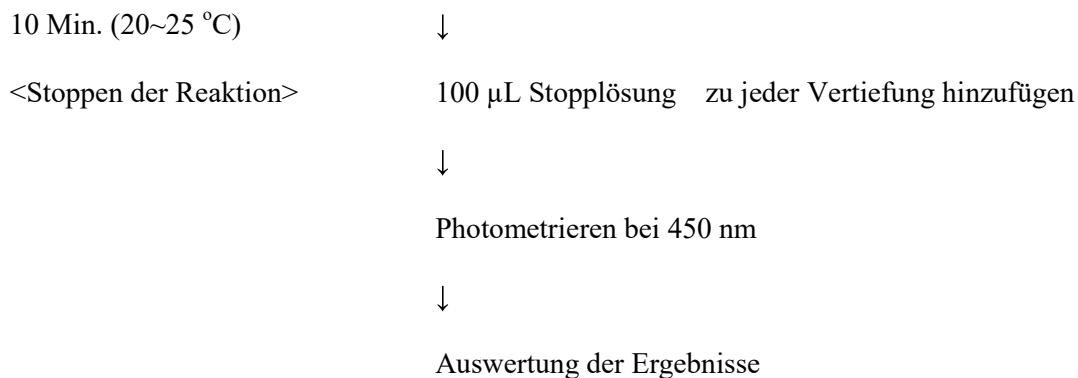
<Konjugatinkubation> 100 µL Konjugatreagenz zu jeder Vertiefung hinzufügen

60 Min. (20~25 °C) ↓

Waschen

↓

<Substratinkubation> 100 µL Substrat zu jeder Vertiefung hinzufügen



REAGENZIEN UND LAGERUNG

Materialien	Mengen (96 Vertiefungen)
Mikrotiterstreifen beschichtet mit anti-Human ECP Antikörper	12 Streifen mit je 8 Vertiefungen
ECP-Standard Natriumazid 0,09%, Ziegenserum 1% Gebrauchsfertig	6 Fläschchen mit je 1,3 mL
Probendiluent Natriumazid 0,09%, Ziegenserum 1% Gebrauchsfertig	1 Fläschchen, 50 mL
Konjugat reagenz (mit Meerrettichperoxidase markierte polyklonale Antikörper gegen menschliches ECP) 1% BSA Gebrauchsfertig	1 Fläschchen, 15 mL
Waschkonzentrat (20fach konzentrierte Lösung)	1 Flasche, 100 mL
Substrat TMB/H ₂ O ₂ Gebrauchsfertig	1 Fläschchen, 20 mL
Stopplösung 0,5 mol/L H ₂ SO ₄ Gebrauchsfertig	1 Fläschchen, 20 mL
Positivkontrolle Natriumazid 0,09%, Ziegenserum 1%	1 Fläschchen, 1,3 mL
Negativkontrolle Natriumazid 0,09%, Ziegenserum 1%	1 Fläschchen, 1,3 mL

Sowohl die ungeöffneten, als auch die erstmalig geöffneten Testkomponenten sind bei 2-8°C bis zum Ablaufdatum auf den Etiketten stabil.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Dieses Produkt ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch bestimmt. Nicht am oder in Menschen anwenden.
- (2) Benutzen Sie keine Testkomponenten über das Verfallsdatum hinaus.
- (3) Tragen Sie Einmalhandschuhe und Augenschutz, wenn Sie Proben bearbeiten und den Test durchführen. Waschen Sie die Hände nach Beendigung sorgfältig.
- (4) Vermeiden Sie den Kontakt von Augen, Haut und Kleidung mit den Reagenzien. Reagenzien auf der Haut müssen mit viel Wasser abgespült werden. TMB ist reizend und die Stopplösung enthält 0,5 mol/l giftige und korrosive Schwefelsäure.

- (5) ECP Standard, Probendiluent, Positivkontrolle und Negativkontrolle enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel und müssen mit Vorsicht benutzt werden. Nicht verschlucken, Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Natriumazid kann mit Kupfer oder Blei in Abwasserleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Deshalb muss bei der Entsorgung von Natriumazidhaltigen Materialien im Ablauf mit viel Wasser nachgespült werden.
- (6) Der ECP Standard, die Probendiluent, das Konjugat reagenz, die Positivkontrolle und die Negativkontrolle enthalten tierisches Material, gewonnen aus nicht-infizierten Tieren. Diese Komponenten sollten beim Gebrauch und der Entsorgung als potentiell biogefährdend betrachtet werden.
- (7) Mischen Sie keine Reagenzien aus anderen Testsystemen.
- (8) Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur gebracht werden (20-25°C)
- (9) Exponieren Sie das Testsystem während des Testlaufs und bei der Lagerung nicht direktem Sonnenlicht.
- (10) Vermeiden Sie mikrobielle und Kreuzkontaminationen der Reagenzien und Proben. Die Kontamination der TMB Substratlösung mit Konjugat reagenz oder anderen Oxidantien führt zur vorzeitigen Farbänderung.
- (11) Inkubationstemperaturen höher oder tiefer als Raumtemperatur (20-25°C), kürzere oder längere Inkubationszeiten und unkorrekte Verdünnungen ergeben falsche Ergebnisse.
- (12) Die Vertiefungen müssen gründlich mit der Waschlösung gewaschen werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.
- (13) Pipettieren Sie jede Probe und jedes Reagenz sorgfältig, um Kreuzreaktionen zwischen den Vertiefungen zu vermeiden. Vermeiden Sie Schaumbildung.
- (14) Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sollten sofort wieder in den Folienbeutel zurückgegeben und dieser sorgfältig verschlossen werden, um die Bildung von Kondensat zu vermeiden. Die Vertiefungen dürfen während der Testdurchführung nicht austrocknen.
- (15) Das Waschkonzentrat kann bei 2~8 °C trüb werden, ohne dass die Leistung des Reagenz dadurch beeinträchtigt wird. Lösen Sie das Waschkonzentrat bei der Herstellung der Waschlösung vollständig auf.
- (16) Die für den Test verwendeten Materialien sollten entsorgt oder wie folgt behandelt werden.
Weichen Sie die Teile für mehr als 1 Stunde in 2%iger Glutaraldehydlösung oder in 0,1%iger Natriumhypochloridlösung (verfügbares Chlor ungefähr 1.000 ppm) ein, oder autoklavieren Sie bei 121 °C für mehr als 20 Minuten.
- (17) Die Ergebnisse dieses Testsystems stellen nur eine Hilfe bei der Diagnose dar. Jeder Arzt muß die Ergebnisse im Spiegel der Patientenhistorie, der physischen Befunde und anderer diagnostischer Verfahren beurteilen.
- (18) Ist die Schutzverpackung beschädigt, sollten die Testsystembestandteile entsprechend den zugehörigen Vorschriften des jeweiligen Landes behandelt oder entsorgt werden.

BENÖTIGTE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- Mikrotiterplatten Reader (Wellenlänge: 450 nm, 620 nm/Referenz)
- Mehrkanal Mikropipette (z.B. 100 µL – 300 µL)
- Einkanalpipetten (z.B. 10 µL und 100 µL)
- Automatisches Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Spritzflasche
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Messzylinder, 1 Liter, zur Herstellung der Waschlösung
- Teströhrchen zur Patientenprobenverdünnung (z.B. 1000 µL)
- Einmal-Pipettenspitzen
- Papierhandtücher
- Mikrotiterplattenabdeckung

TESTDURCHFÜHRUNG

■ HERSTELLUNG DER REAGENZIEN

- 1) Bringen Sie alle Testmaterialien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (20-25°C)
- 2) Mikrotiterstreifen: Entnehmen Sie die benötigte Anzahl Mikrotiterstreifen aus dem Beutel und platzieren Sie sie im Halterahmen. Die unbenutzten Streifen müssen sofort wieder im Beutel verschlossen und eingefroren werden.
- 3) Waschlösung: Das Waschkonzentrat muß vor der Verwendung verdünnt werden. Verdünnen Sie das Waschkonzentrat 1:10; fügen Sie 100 mL zu 900 mL destilliertem Wasser. Die verdünnte Waschlösung ist bei 2-8°C für 2 Wochen stabil.
- 4) Verdünnen Sie nicht den ECP Standard, die Probendiluent, das Konjugat reagenz, das Substrat und die Stopflösung. Diese Reagenzien sind gebrauchsfertig.

■ HERSTELLUNG DER KONTROLLEN

Verdünnung der Kontrollen

Verdünnen Sie die Positivkontrolle und die Negativkontrolle 1:5 mit Probendiluent Beispielsweise durch hinzufügen von 50 µL Kontrolle zu 200 µL Probendiluent

* Verdünnen Sie die Kontrollen für jeden Testlauf frisch, da sie nicht gelagert werden können.

■ HERSTELLUNG DER PROBEN

1) Probennahme

Die Serumspiegel von ECP können sich durch den *in vitro Effekt* nach der Probennahme verändern. Es besteht die Möglichkeit dass *in vitro* ECP aus den eosinophilen Zellen während der Koagulation freigesetzt wird. Jedes Labor sollte daher seine eigenen Verfahren zur Probennahme und Behandlung der Proben festlegen. Das folgende Verfahren ist beschrieben worden:

Blut für die Bestimmung von ECP wurde in Vacutainer SST Röhrchen (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J., USA) abgenommen. Die Gerinnung wurde während genau 60 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Dann wurde das Serum durch Zentrifugieren abgetrennt (10 Minuten bei 1200 g) und in ein neues Gefäß überführt. Es wurde bei -20 °C bis zur Testdurchführung aufbewahrt.

2) Verdünnung der Proben (Human serum)

Jede Probe wird mit Probendiluent 1:5 verdünnt.

Zum Beispiel : 50 µL Probe zu 200 µL Probendiluent.

* Verdünnen Sie die Proben für jeden Testlauf frisch, da sie nicht gelagert werden können.

3) Lagerung

Der Test sollte mit frisch gewonnenen Patientenproben durchgeführt werden. Die Proben sollten so bald als möglich nach der Entnahme getestet werden.

Wird Lagerung erforderlich, sollten die Proben bei unter -20 °C gelagert werden. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

■ TESTABLAUF

SCHRITT 1. (PROBENINKUBATION)

Pipettieren Sie mit einer Mehrkanal Mikropipette jeweils 100 µL des ECP Standards, der verdünnten Patientenserien, der Positiv- und Negativkontrollen in die dafür vorgesehenen

Vertiefungen der Mikrotiterstreifen (Den ECP Standard nicht verdünnen.).

* Die Inkubation startet durch Pipettieren in die Vertiefungen. Das Pipettieren sollte so schnell wie möglich durchgeführt werden.

Decken Sie die Vertiefungen mit einer Mikroplatten Abdeckung ab und inkubieren Sie sie für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C)

SCHRITT 2. (WASCHEN)

Saugen Sie den Inhalt der Vertiefungen ab oder verwerfen Sie ihn. Füllen Sie die Vertiefungen mit Waschlösung und saugen Sie den Inhalt ab oder verwerfen Sie ihn. Waschen Sie 4 mal. Klopfen Sie die Platte auf ein Papiertuch und entfernen Sie die verbliebene Waschlösung. Wenn ein automatischer Wascher benutzt wird, waschen Sie 4 mal.

* Jedem Labor wird empfohlen, seine eigenen Waschzeiten und -bedingungen festzulegen.

* Der Waschlösung sollte bei Raumtemperatur (20-25°C) verwendet werden.

SCHRITT 3. (KONJUGATINKUBATION)

Geben Sie jeweils 100 µL Konjugatreagenz mit einer Mehrkanal Mikropipette in jede Vertiefung.

Decken Sie die Vertiefungen mit einer Mikroplatten Abdeckung ab und inkubieren Sie sie für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20~25 °C)

* Geben Sie entnommenes Konjugatreagenz nicht wieder in das Fläschchen zurück!

SCHRITT 4. (WASCHEN)

Die Mikrotiterplatte waschen, wie in SCHRITT 2. beschrieben.

SCHRITT 5. (SUBSTRATINKUBATION)

Geben Sie jeweils 100 µL Substrat mit einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung

* Geben Sie entnommenes Substrat nicht wieder in das Fläschchen zurück!

Decken Sie die Vertiefungen mit einer Mikroplatten Abdeckung ab und inkubieren Sie sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur (20~25 °C)

SCHRITT 6. (STOPPEN)

Geben Sie jeweils 100 µL Stoplösung mit einer Mehrkanal Mikropipette in jede Vertiefung

■ ABLESUNG

Messen Sie die optische Dichte (OD) jeder Vertiefung bei 450 nm. Bei Verwendung eines Photometers mit zwei Wellenlängen erfolgt die Extinktionsmessung bei 450 nm, die Referenzmessung bei 620 nm.

* Die Ablesung sollte innerhalb von 20 Minuten nach dem Abstoppen erfolgen

* Vor dem Ablesen der Platte sollten Sie sicherstellen, dass der Boden der Mikrotiterplatte trocken und sauber ist und sich dass keine Luftblasen auf der Oberfläche der Vertiefungen befinden.

■ AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

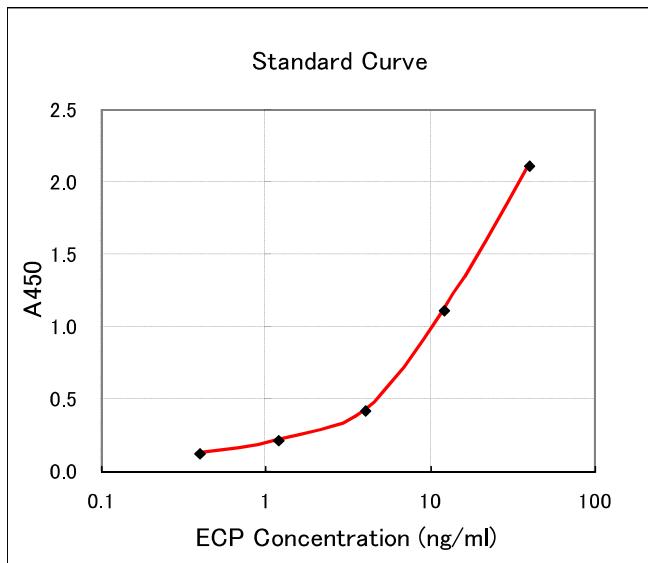
Berechnen Sie den Mittelwert der OD jedes Standards und tragen Sie ihn gegen den log der Standardkonzentration auf semi-logarithmischem Millimeterpapier auf. Die Konzentration der Proben kann dann aus der Standardkurve abgelesen werden.

Wird ein entsprechendes Programm zur automatischen Bestimmung der Konzentration benutzt, empfehlen wir, zur Umrechnung diejenige Kurve zu benutzen, die am besten auf die Standard-Werte passt.

Die ECP-Konzentration der Proben wird an der Standardkurve abgelesen und mit dem Verdünnungsfaktor (z.B.5) multipliziert.

* Ein internationaler Referenzpräparation für ECP ist nicht verfügbar. ECP wurde gereinigt und seine Proteinkonzentration mittels einer UV-Absortions- und Proteinbestimmungsmethode gemessen.

■ BEISPIEL EINER STANDARDKURVE



■ QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf müssen folgende Kriterien erfüllt sein.

A₄₅₀ des ECP-Standard 1: $\leq 0,2$

A₄₅₀ des ECP-Standard 6: $\geq 1,2$

Die Positiv- und Negativkontrollen müssen folgende Ergebnisse zeigen:

ECP-Wert (ng/mL): Wie auf jedem Etikett beschrieben.

Wird mindestens ein Kriterium nicht erfüllt, sind die Ergebnisse ungültig und der Testlauf sollte wiederholt werden.

Ehe der Testlauf wiederholt wird, sollten folgende Parameter überprüft werden.

- Inkubationstemperatur
- Inkubationszeiten
- Waschen

■ KONZENTRATION VON MENSCHLICHEM ECP IN NORMALEM HUMANSERUM.

Mit dem MESACUP ECP TEST wurden Serumproben von gesunden Blutspendern gemessen.

Es wurden Seren von 148 gesunden Spendern gemessen. Nach Ausschluss der Proben, deren Werte über dem mean (Durchschnitt)+3 SD (Standardabweichung) lagen, wurde der Durchschnitt und die Standardabweichung erneut bestimmt : mean + 3 SD = 15,6 ng/mL.

Probenzahl n = 148 ; mean = 4,06 ng/mL ; SD=3,86 ; mean+3SD=15,6 ng/mL

■ GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei anderen diagnostischen Testprozeduren dienen die mit dem MESACUP ECP TEST erhaltenen Ergebnisse ausschließlich als Hilfe bei der Diagnose und sind nicht selbst als Diagnose zu interpretieren.

LEISTUNGSMERKMALE

■ EMPFINDLICHKEIT

A 450 des ECP-Standards 1 (0 ng/mL) sollte ≤ 0.2 sein

A 450 des ECP-Standards 6 (40 ng/mL) sollte $\geq 1,2$ sein

■ SPEZIFITÄT

Werden Kontrollproben bekannter Konzentration gemessen, sollte jeder Wert innerhalb von $\pm 20\%$ der bekannten Konzentration liegen.

■ REPRODUZIERBARKEIT

Werden 3 Kontrollproben mit bekannter Konzentration parallel achtfach gemessen, sollte der CV% jeder Probe innerhalb von 15% liegen.

■ INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Bilirubin F (bis zu 18,3 mg/dL), Bilirubin C (bis zu 19,0 mg/dL), Chyle (bis zu 1.390 Units als Formazin) und/oder Rheumafaktor (bis zu 500 IU/mL) beeinflussen das Testergebnis nicht.

Vermeiden Sie die Verwendung stark lipämischer Proben.

Hämoglobin beeinflußt das Testergebnis. Benutzen Sie keine hämolysierten Proben.

Es wurde kein Effekt auf die Testergebnisse gefunden, wenn bis zu 500 ng/mL EDN zugefügt wurden.

■ MESSBEREICH

Der Testbereich des Testsystems reicht von 0,125 ng/mL bis 40 ng/mL.

LITERATUR:

1. Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150 (1986)
2. Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
3. Peterson, C., et al., Eur. J Haematol., 40, 415-423 (1988)
4. Zimmerman, B., et al., Clin Exp Allergy, 23, 564-570 (1993)

Español

USO PREVISTO

El kit MESACUP ECP TEST es un ensayo cuantitativo para la determinación de ECP en el suero mediante la técnica de sándwich ELISA.

El MESACUP ECP TEST es solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La Proteína Catiónica del Eosinófilo (ECP), la Neurotoxina derivada del Eosinófilo (EDN) y la Proteína Básica Mayoritaria (MBP), son las principales proteínas mediadoras que se producen en los eosinófilos activados. ECP y EDN se encuentran en la matriz de gránulos de los eosinófilos, mientras que la MBP se encuentra en el núcleo o “core” de los gránulos. ECP y EDN forman parte de la superfamilia de la ribonucleasa A. Tanto la ECP como la MBP poseen una elevada toxicidad. Los eosinófilos activados juegan un papel importante en la respuesta asmática tardía y en la inflamación de las vías aéreas en el asma. Dado que la ECP se secreta por los eosinófilos activados, ésta proteína puede usarse como marcador de activación eosinófila y degranulación.

El kit "MESACUP ECP TEST" es para medir específicamente y con alta sensibilidad la proteína ECP por la técnica de ELISA.

PRINCIPIO

El MESACUP ECP TEST mide ECP humana por un ELISA sándwich.

Las muestras y los estándares de la curva de calibración se incuban en los pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti- ECP humana. Después de lavar, se añade en los pocillos un anticuerpo policlonal anti-ECP humana, conjugado con peroxidasa y se incuba. Después de otro lavado, se añade el sustrato a los pocillos y se incuba por un periodo de tiempo adicional. Finalmente se añade una solución ácida a los pocillos para detener la reacción y estabilizar el color que se ha desarrollado. La densidad óptica (D.O.) se determina para cada pocillo utilizando un lector de microplacas, a una longitud de onda de 450 nm. La concentración de ECP se interpola en la curva que se obtiene a partir de estándares patrones.

BREVE PROTOCOLO DEL ENSAYO

<Incubación de la muestra> Añadir 100 µL de la muestra diluida (1:5) en cada pocillo de la microplaca.

(20~25°C) 60 min. ↓

Javar

1

<Incubación del Conjugado> Añadir 100 μ L de Reactivo conjugado en cada pocillo.

(20~25°C) 60 min

1

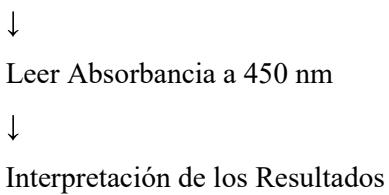
卷之三

1

<Incubación del Sustrato> Añadir 100 μ L de Sustrato en cada pozo

(20~25 °C) 10 min.

A



REACTIVOS Y CONSERVACIÓN

Materiales	Cantidad (96 pocillos)
Tiras de micropocillos recubiertos con anticuerpos anti-human ECP	12 tiras x 8 pocillos
Estándar ECP azida de sodio 0,09%, Suero de cabra 1% Listo para usar	6 viales x 1,3 mL
Diluente de ensayo azida de sodio 0,09%, Suero de cabra 1% Listo para usar	1 vial x 50 mL
Reactivos conjugados (anticuerpo anti-ECP humana policlonal, conjugada con Peroxidasa de rábano picante) 1% BSA Listo para usar.	1 vial x 15 mL
Solución de lavado concentrada (Solución concentrada x 20)	1 vial x 100 mL
Sustrato TMB/H ₂ O ₂ Listo para usar	1 vial x 20 mL
Solución de parada 0,5 mol/L H ₂ SO ₄ Lista para usar	1 vial x 20 mL
Control positivo azida de sodio 0,09%, Suero de Cabra 1%	1 vial x 1,3 mL
Control negativo azida de sodio 0,09%, Suero de Cabra 1%	1 vial x 1,3 mL

Tanto los componentes del kit abiertos como los sellados son estables hasta la fecha de caducidad, conservados a 2-8°C.

PRECAUCIONES

- (1) Este producto es solo para diagnóstico *in vitro*. No utilizar en seres humanos.
- (2) No utilizar los componentes del kit después de su fecha de caducidad.
- (3) Usar guantes desechables y protección para los ojos mientras se manipula las muestras y realizando el ensayo. Lavarse muy bien las manos al terminar.
- (4) Evitar el contacto de los reactivos con los ojos, piel y prendas de vestir. Los reactivos en la piel deben lavarse con abundante agua. TMB es irritante y la Solución de parada consiste de ácido sulfúrico 0,5 mol/l, es un veneno y corrosivo.
- (5) El Estándar ECP, el Diluyente de ensayo, el Control positivo y negativo contienen azida de sodio (0,09%) como conservante y se deben manipular con precaución. No ingerir ni permitir el contacto con la piel o membranas mucosas. La azida de sodio puede reaccionar con el cobre o el plomo de las cañerías formando azidas metálicas explosivas. Por lo tanto, siempre enjuagar con abundante agua al

eliminar materiales que contienen azida de sodio por el desagüe.

- (6) El Estándar ECP, el Diluyente de ensayo, el Reactivo conjugado el Control positivo y negativo contienen material de origen animal, obtenido de animales no infectados. Sin embargo estos componentes deben tratarse como potencialmente bio peligrosos al utilizarlos y al eliminarlos.
- (7) No mezclar reactivos de kits diferentes.
- (8) Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20~25°C) antes de iniciar el ensayo.
- (9) No exponer el kit a la luz solar directa durante la prueba o el almacenaje
- (10) Evitar la contaminación microbiana y cruzada de los reactivos o muestras.
La contaminación de la solución de sustrato TMB con Reactivo conjugado u otros oxidantes provocara que la solución cambie de color en forma prematura.
- (11) Las temperaturas de incubación por sobre o por debajo de la temperatura ambiente (20~25°C), tiempos de incubación más cortos o más largos, así como inexactitud en las diluciones pueden dar origen a resultados erróneos.
- (12) Los pocillos han de lavarse debidamente con la Solución de lavado para evitar resultados falsos positivos.
- (13) Pipetear con cuidado cada muestra y reactivo para evitar la contaminación cruzada entre los micropocillos; evitar la formación de espuma.
- (14) Todas las Tiras de micropocillos no utilizadas deben devolverse a la bolsa sellable que debe cerrarse cuidadosamente para evitar la absorción de humedad. No dejar que los pocillos se sequen durante el procedimiento del ensayo.
- (15) El Solución de lavado concentrada (10x) puede volverse turbio a 2-8°C, esto no produce resultados inconsistentes. Al preparar la Solución de lavado, disolver totalmente el Solución de lavado concentrada (10x).
- (16) Los materiales utilizados en esta prueba se deben eliminar o tratarse como se describe a continuación.
Remojar en una solución de glutaraldehído, concentración final de 2% durante más de una hora, remojar en una solución de hipoclorito de sodio 0,1% (cloro disponible: aproximadamente 1000 ppm) durante más de una hora o en una autoclave a 121°C durante más de 20 minutos.
- (17) Los resultados obtenidos mediante este ensayo solo ayudan al diagnóstico. Cada médico debe interpretar estos resultados a la luz de los antecedentes del paciente, los hallazgos físicos y otros procedimientos diagnósticos.
- (18) En caso de que el envase protector del kit este dañado, los componentes deben tratarse o eliminarse según las instrucciones pertinentes y normativas de cada país.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de microplacas (longitud de onda: 450 nm, 620 nm/referencia)
- Micropipeta multicanal (p. ej. 100 µL - 300 µL)
- Pipeta de un solo canal (p. ej. 10 µL y 100 µL)
- Lavador de placas o botella lavadora
- Agua destilada o desionizada
- Probeta graduada de un litro para preparar la Solución de lavado
- Tubos de ensayo para la dilución de las muestras de los pacientes (p. ej. 1000 µL)
- Puntas desechables de pipetas
- Toallas de papel
- Cubierta de microplaca

PROCEDIMIENTO

■ PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- 1) Todos los materiales del ensayo deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de utilizar.
- 2) Tiras de micropocillos: Sacar el número necesario de Tiras de micropocillos de la bolsa y colocarlas en el marco de soporte. Devolver las tiras no utilizadas rápidamente a su almacenaje refrigerado.
- 3) Solución de lavado: El Solución de lavado concentrada (10x) debe diluirse antes de utilizar. Diluir el Solución de lavado concentrada (10x) 1: 10 añadiendo 100 mL del Solución de lavado concentrada (10x) a 900 mL de agua destilada. La Solución de lavado diluida es estable durante dos semanas a 2-8 °C.
- 4) No diluir el Estándar ECP, el Diluyente de ensayo, Reactivo conjugado, Sustrato y Solución de parada. Estos reactivos están listos para utilizar.

■ PREPARACIÓN DE CONTROLES

Dilución de controles

Diluir el Control positivo y el Control negativo 1:5 con el Diluyente de ensayo.
Por ejemplo, añadiendo 50 µL de control a 200 µL de Diluyente de ensayo.

* Diluir los controles para cada ensayo ya que no se pueden almacenar.

■ PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1) Toma de muestras

Los niveles de ECP en suero pueden variar por un efecto *in vitro* después de la toma de muestra. Existe la posibilidad de que se produzca una liberación de ECP *in vitro* de los eosinófilos durante el proceso de coagulación. Por tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca su propio protocolo para la toma de muestras. A continuación está el procedimiento notificado para toma de muestra.

La sangre para la determinación de ECP se tomó en tubos Vacutainer SST (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J., USA). Posteriormente se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante exactamente 60 minutos. Posteriormente el suero se separó por centrifugación durante 10 min. a 1200 x g, seguidamente fue transferido a un nuevo tubo de ensayo y almacenado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2) Dilución de la muestra (Suero humano)

Diluir cada muestra 1:5 con Diluyente de ensayo.
Ej. Añadiendo 50 µL de muestra a 200 µL de Diluyente de ensayo.

* Diluir las muestras para cada ensayo ya que no se pueden almacenar

3) Almacenamiento

Utilizar suero fresco del paciente. Las muestras deben analizarse lo antes posible después de tomadas. Si es necesario almacenarlas debe hacerse a -20 °C o inferior. No repetir ciclos de congelación descongelación.

■ PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

PASO 1. (INCUBACIÓN DE LA MUESTRA)

Transferir 100 µL del Estándar ECP, cada muestra diluida, el Control positivo y negativo con una micropipeta multicanal en los pocillos correspondientes. (NO diluir el Estándar ECP.)

- * La incubación se inicia en el momento en que se transfieren las muestras a los pocillos. El pipeteo se debe completar lo más rápidamente posible.
- Cubrir los pocillos e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).

PASO 2. (LAVADO)

Aspirar o decantar el contenido de los pocillos. Llenar los pocillos con Solución de lavado y volver a aspirar o decantar el contenido de los pocillos. Lavar 4 veces. Golpear la placa sobre una toalla de papel para eliminar toda la Solución de lavado remanente. Si utiliza un lavador automático, lavar 4 veces.

- * Se recomienda que cada laboratorio confirme sus tiempos de lavado adecuados y otras condiciones.
- * La Solución de lavado se debe utilizar a 20-25°C.

PASO 3. (INCUBACIÓN DEL CONJUGADO)

Añadir 100 µL del Reactivo conjugado en cada pocillo con una micropipeta multicanal.

Cubrir los pocillos con la cubierta de la microplaca e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

- * No devolver el Reactivo conjugado al vial, una vez sacado.

PASO 4. (LAVADO)

Lavar la microplaca como en el PASO 2.

PASO 5. (INCUBACIÓN DEL SUSTRATO)

Añadir 100 µL del Sustrato en cada pocillo con una micropipeta multicanal.

- *No devolver el Sustrato al vial una vez sacado.

Cubrir los pocillos con la cubierta de la microplaca e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

PASO 6. (REACCIÓN DE PARADA)

Añadir 100 µL de Solución de parada en cada pocillo con una micropipeta multicanal.

■ LECTURA

Leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm. En caso de usar un lector de doble haz, colocar la longitud de onda de lectura a 450 nm y la de referencia a 620 nm.

*La lectura ha de realizarse dentro de los 20 minutos después de detener la reacción.

*Antes de leer la placa, asegurarse que el fondo de la placa esté limpio y seco y que no hay burbujas de aire en la superficie del líquido en los pocillos.

■ CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

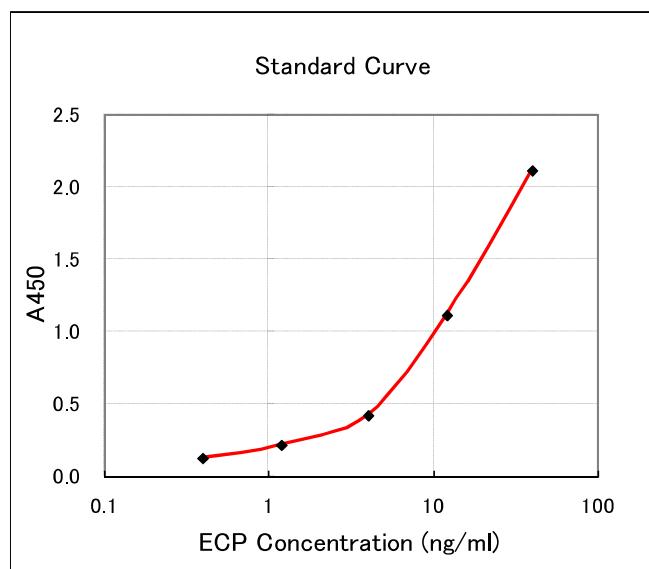
Calcular la absorbancia media de cada estándar y trazar la curva estándar contra la concentración en un papel de gráfico adecuado. Las concentraciones de las muestras se pueden leer de la curva estándar.

Si usa un programa para calcular automáticamente la concentración, se recomienda utilizar la curva que dé el mejor ajuste.

Informar la concentración de ECP de las muestras multiplicando el valor leído de la curva estándar por el factor de dilución (p. ej. x5).

*No existe un material de referencia para ECP. ECP se purificó y se midió la concentración de proteínas con un método de absorbancia ultravioleta y un método de medición de proteínas.

■ EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR



■ CONTROL DE CALIDAD

Cada resultado del ensayo debe cumplir con los siguientes criterios.

A₄₅₀ de Estándar ECP 1 : $\leq 0,2$

A₄₅₀ de Estándar ECP 6 : $\geq 1,2$

Los Controles positivo y negativo deben dar los siguientes resultados:

Valor ECP (ng/mL) : Como aparece en cada etiqueta.

Si alguno de estos no se cumple, los resultados no son válidos y la prueba debe repetirse.

Antes de repetir el ensayo, comprobar los siguientes procedimientos.

- Temperatura de incubación.
- Tiempo de incubación
- Lavado

■ CONCENTRACIÓN DE ECP HUMANA EN SUERO HUMANO NORMAL.

Muestras de suero de donantes de sangre sanos se analizaron con MESACUP ECP TEST.

Se analizaron 148 sueros de donantes sanos. Después de eliminar las muestras que resultaron sobre el promedio + 3DE, el Nuevo promedio + 3DE resultó ser: promedio + 3DE = 15,6 ng/mL.

Muestra n = 148 promedio = 4,06 ng/mL DE = 3,86 promedio+3DE = 15,6 ng/mL

■ LIMITACIONES

Tal como en otros procedimientos de pruebas, el resultado obtenido con MESACUP ECP TEST sirve solo como ayuda en el diagnóstico y no se debe interpretar como un diagnóstico en sí mismo.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

■ SENSIBILIDAD

A₄₅₀ de Estándar ECP 1 (0 ng/mL) será ≤ 0,2

A₄₅₀ de Estándar ECP 6 (40 ng/mL) será ≥ 1,2

■ ESPECIFICIDAD

Al analizar muestras de control cuya concentración es conocida, cada valor debe caer dentro ±20% de la concentración conocida.

■ REPRODUCIBILIDAD

Al analizar tres muestras de control de ocho concentraciones conocidas al mismo tiempo, el CV% de cada muestra debe caer dentro del 15%.

■ SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN EN EL ENSAYO

Bilirrubina F (hasta 18,3 mg/dL), Bilirrubina C (hasta 19,0 mg/dL), Chyle (hasta 1390 unidades de Formacina) y/o factor Reumatoide (hasta 500 IU/mL) no afectan el resultado del ensayo, pero se recomienda evitar el uso de muestras altamente lipémicas.

La Hemoglobina afecta a los resultados del ensayo. No utilizar muestras hemolizadas.

La adición de hasta 500 ng/mL de EDN no produjo ningún efecto en los valores del ensayo.

■ RANGO DE ENSAYO

El rango de ensayo para el kit es entre 0,125 ng/mL y 40 ng/mL.

REFERENCIAS

1. Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150 (1986)
2. Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
3. Peterson, C., et al., Eur. J Haematol., 40, 415-423 (1988)
4. Zimmerman, B., et al., Clin Exp Allergy, 23, 564-570 (1993)

Italiano

USO PREVISTO

Il MESACUP ECP TEST consiste in un kit per l'analisi quantitativa della proteina ECP presente nel siero umano mediante il metodo ELISA a "sandwich".

Il MESACUP ECP TEST è destinato all'uso diagnostico *in vitro*.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La proteina cationica degli eosinofili (ECP), la neurotossina eosinofilo-derivata (EDN) e la proteina basica maggiore (MBP) sono conosciute quali principali mediatori proteici derivati dagli eosinofili attivati. Le proteine ECP ed EDN sono presenti nella matrice dei granuli degli eosinofili, mentre la proteina MBP si trova nella parte centrale (core) dei granuli. ECP ed EDN sono membri della superfamiglia delle ribonucleasi A. ECP e MBP sono caratterizzate da elevata citotossicità. Gli eosinofili attivati svolgono un ruolo importante nella risposta asmatica tardiva e nell'infiammazione asmatica delle vie aeree. Mentre ECP viene secreta dagli eosinofili attivati, ECP può essere un marcitore dell'attivazione e della degranulazione degli eosinofili.

Il MESACUP ECP TEST permette di misurare la proteina ECP mediante ELISA in modo specifico e con un'elevata sensibilità.

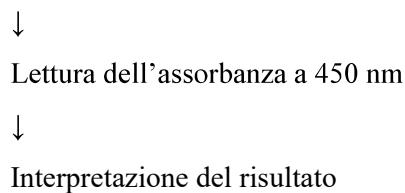
PRINCIPIO

Il MESACUP ECP TEST misura la proteina ECP umana mediante la tecnica ELISA a "sandwich".

Nei pozzetti rivestiti con anticorpo monoclonale anti-ECP umana si procede all'incubazione dei campioni e degli standard. Dopo il lavaggio, si aggiunge ai micropozzetti un anticorpo policlonale anti-ECP umana coniugato con perossidasi e si incuba. Dopo un altro lavaggio, si aggiunge il substrato della perossidasi e si lascia procedere l'incubazione. Quindi si aggiunge una soluzione acida per bloccare la reazione enzimatica e stabilizzare lo sviluppo del colore. Si procede quindi alla misurazione della densità ottica (O.D.) di ogni pozzetto mediante un lettore di micropiastre a 450 nm. La concentrazione della proteina ECP viene ricavata dalla curva standard costruita in base agli standard di riferimento.

PROCEDURA D'ANALISI IN BREVE

<Incubazione del Campione>	A ogni pozzetto della piastra aggiungere 100 µL di Campione diluito (1:5).
(20~25°C) 60 min.	↓
	Lavare
	↓
<Incubazione del Coniugato>	A ogni pozzetto aggiungere 100 µL del Coniugato.
(20~25°C) 60 min.	↓
	Lavare
	↓
< Incubazione del Substrato>	A ogni pozzetto aggiungere 100 µL di Substrato.
(20~25°C) 10 min.	↓
	A ogni pozzetto aggiungere 100 µL di Soluzione bloccante.



REAGENTI E CONSERVAZIONE

Materiali	Quantità (96 pozzi.)
Strip di micropozzetti rivestiti con anticorpo anti-ECP umana	8 pozzi. x 12 strip
Standard ECP 0,09% sodio azoturo, 1% siero di capra Pronto per l'uso	1,3 mL x 6 flaconcini
Diluente del test 0,09% sodio azoturo, 1% siero di capra Pronto per l'uso	50 mL x 1 flacone
Coniugato (perossidasi di rafano coniugata ad anticorpo policlonale anti-ECP umana) 1% BSA Pronto per l'uso	15 mL x 1 flacone
Soluzione di lavaggio concentrata (soluzione concentrata 20 X)	100 mL x 1 flacone
Substrato TMB/H ₂ O ₂ Pronto per l'uso	20 mL x 1 flacone
Soluzione bloccante 0,5 mol/L H ₂ SO ₄ Pronto per l'uso	20 mL x 1 flacone
Controllo positivo 0,09% sodio azoturo, 1% siero di capra	1,3 mL x 1 flaconcino
Controllo negativo 0,09% sodio azoturo, 1% siero di capra	1,3 mL x 1 flaconcino

I componenti del kit, sia quelli ancora sigillati che quelli già aperti, sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati a 2-8°C.

PRECAUZIONI

- (1) Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro*. Non utilizzare nell'uomo.
- (2) Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza indicata.
- (3) Durante la manipolazione dei campioni e l'esecuzione dell'analisi, indossare guanti monouso e una protezione per gli occhi. Al termine, lavare accuratamente le mani.
- (4) Evitare il contatto dei reagenti con occhi, cute o indumenti. I reagenti entrati in contatto con la cute vanno lavati con abbondante acqua. La soluzione TMB è irritante e la Soluzione bloccante contiene 0,5 mol/L di acido solforico, che è un veleno e un agente corrosivo.
- (5) Lo Standard ECP, il Diluente del test, il Controllo positivo e il Controllo negativo contengono sodio azoturo (0,09%) come conservante e vanno maneggiati con cautela. Non ingerire o far entrare in contatto con la cute o le membrane mucose. Il sodio azoturo può reagire con il rame o il piombo presenti nelle tubature di scarico formando azoturi metallici esplosivi. Quindi far sempre defluire abbondante acqua quando si scaricano nelle condutture materiali contenenti sodio azoturo.

- (6) Lo Standard ECP, il Diluente del test, il Coniugato, il Controllo positivo e il Controllo negativo contengono materiali di origine animale, prelevati da animali non infetti. Tuttavia questi componenti devono essere trattati come materiali a potenziale rischio biologico, sia durante l'uso che durante il loro smaltimento.
- (7) Non miscelare tra loro reagenti di kit diversi.
- (8) Prima di iniziare l'analisi tutti i reagenti vanno portati a temperatura ambiente (20-25°C).
- (9) Non esporre il kit alla luce diretta del sole durante il test e durante la conservazione.
- (10) Evitare la contaminazione microbica e incrociata dei reagenti o dei campioni.

La contaminazione della Soluzione del substrato TMB con il Coniugato o con altri ossidanti indurrà precocemente un cambiamento di colore della soluzione.
- (11) Temperature di incubazioni superiori o inferiori alla normale temperatura ambiente (20-25°C), tempi di incubazione più brevi o più prolungati e diluizioni inaccurate possono fornire risultati errati.
- (12) I pozzetti devono essere risciacquati appropriatamente con la Soluzione di lavaggio per evitare risultati falsi positivi.
- (13) Pipettare con attenzione tutti i campioni e i reagenti per evitare contaminazioni incrociate tra i micropozzetti, evitando la formazione di schiuma.
- (14) Tutti gli strip inutilizzati vanno riposti subito nella busta con chiusura a zip, che va accuratamente richiusa per evitare l'assorbimento di umidità.
Durante la procedura di analisi evitare che i pozzetti si secchino.
- (15) La Soluzione di lavaggio concentrata (10x) può diventare torbido a 2-8°C, ciò non compromette i risultati.
Dissolvere completamente la Soluzione di lavaggio concentrata (10x) quando si prepara la Soluzione di lavaggio.
- (16) I materiali usati per il test vanno smaltiti o trattati come indicato di seguito.

Immergere in una soluzione di glutaraldeide alla concentrazione finale del 2% per più di 1 ora; immergere in una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,1% (cloro disponibile: circa 1.000 ppm) per più di 1 ora o autoclavare a 121°C per più di 20 minuti.
- (17) I risultati ottenuti da questo saggio sono da considerarsi esclusivamente come aiuto alla formulazione della diagnosi. Ogni medico deve interpretare questi risultati alla luce dell'anamnesi del paziente, dell'esame obiettivo e di altre procedure diagnostiche.
- (18) Nel caso in cui la confezione protettiva risulti danneggiata, i componenti del kit vanno trattati o smaltiti in conformità con le istruzioni e i regolamenti applicabili in ciascun paese.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Lettore di micripiastre (lunghezza d'onda: 450 nm, 620 nm per il riferimento)
- Micropipetta multicanale (per es. 100 µL - 300 µL)
- Micropipetta monicanale (per es. 10 µL & 100 µL)
- Sistema automatico di lavaggio o bottiglia di lavaggio
- Acqua deionizzata o distillata
- Cilindro graduato da 1 litro per la preparazione della Soluzione di lavaggio
- Provette d'analisi per le diluizioni dei campioni dei pazienti (per es. da 1.000 µL)
- Puntali monouso per pipetta

- Carta assorbente
- Coperchio per micropiastre

PROCEDURA

■ PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- 1) Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente (20-25 °C) tutti i materiali necessari all'analisi.
- 2) Strip di micropozzetti: prelevare dalla busta gli Strip di micropozzetti necessari e inserirli nel supporto. La busta con gli strip non utilizzati va rimessa subito in frigorifero.
- 3) Soluzione di lavaggio: la Soluzione di lavaggio concentrata (10x) va diluita prima dell'uso. Diluire 1:10 la Soluzione di lavaggio concentrata (10x) aggiungendo 100 mL della Soluzione di lavaggio concentrata (10x) a 900 mL di acqua distillata. La Soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a 2-8 °C.
- 4) I reagenti Standard ECP, Diluente del test, Coniugato, Substrato e Soluzione bloccante non vanno diluiti perché sono pronti per l'uso.

■ PREPARAZIONE DEI CONTROLLI

Diluizione dei controlli

Diluire 1:5 il Controllo positivo e il Controllo Negativo con il Diluente del test.
Per esempio, aggiungere 50 µL di Controllo a 200 µL di Diluente del test.

* Diluire solo i controlli necessari per ogni singola analisi, perché non possono essere conservati.

■ PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1) Prelievo dei campioni

I livelli sierici di ECP possono variare a causa di effetti *in vitro* successivi al prelievo. È possibile che durante il processo di coagulazione avvenga il rilascio *in vitro* di ECP da parte degli eosinofili. Si raccomanda quindi a ogni laboratorio di standardizzare la propria procedura di raccolta dei campioni. Di seguito si riporta una procedura di raccolta.

Il sangue per la misurazione della proteina ECP viene raccolto in provette Vacutainer SST (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J., USA) e viene lasciato coagulare a temperatura ambiente esattamente per 60 minuti. Quindi il siero viene separato tramite centrifugazione, 10 minuti a 1200 x g, e infine trasferito in una nuova provetta, conservandolo a -20 °C fino al momento dell'analisi.

2) Diluizione dei campioni (Siero umano)

Diluire 1:5 ogni campione con il Diluente del test.
Per esempio, aggiungere 50 µL di campione a 200 µL di Diluente del test.

* Diluire solo i campioni necessari per ogni singola analisi, perché non possono essere conservati.

3) Conservazione

Usare sieri freschi dei pazienti. Dopo la raccolta, i campioni vanno analizzati il prima possibile.

Se è necessario procedere alla conservazione, i campioni vanno mantenuti a -20°C o a una temperatura inferiore. Non ripetere cicli di congelamento/scongelamento.

■ PROCEDURA DI ANALISI

FASE 1. (INCUBAZIONE DEI CAMPIONI)

Con la micropipetta multicanale trasferire 100 µL di Standard ECP, di ogni campione diluito, del Controllo positivo e del Controllo negativo nei micropozzetti designati (non diluire lo Standard ECP).

- * L'incubazione inizia non appena si pipetta il composto nel micropozzetto. La fase di pipettatura va completata il più rapidamente possibile.

Coprire i pozzetti con un coperchio per micropiastre e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).

FASE 2. (LAVAGGIO)

Aspirare o scartare il contenuto del pozzetto. Riempire il pozzetto con la Soluzione di lavaggio e quindi aspirare o scartare tutto il contenuto. Lavare 4 volte. Picchiettare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'eventuale Soluzione di lavaggio rimanente. Se si utilizza un sistema automatico di lavaggio, lavare 4 volte.

- * Si raccomanda a ogni laboratorio di standardizzare i propri appropriati tempi di lavaggio e le altre condizioni.

* La Soluzione di lavaggio va utilizzata a 20-25°C.

FASE 3. (INCUBAZIONE DEL CONIUGATO)

Con la micropipetta multicanale, aggiungere 100 µL del Coniugato a ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con il coperchio per micropiastre e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).

- * Una volta estratto, non rimettere nel flacone il Coniugato inutilizzato.

FASE 4. (LAVAGGIO)

Lavare la micropiastra come descritto nella FASE 2.

FASE 5. (INCUBAZIONE DEL SUBSTRATO)

Con la micropipetta multicanale, aggiungere 100 µL di Substrato a ogni pozzetto.

- * Una volta estratto, non rimettere nel flacone il Substrato inutilizzato.

Coprire i pozzetti con il coperchio per micropiastre e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).

FASE 6. (REAZIONE DI BLOCCO)

Con la micropipetta multicanale, aggiungere 100 µL di Soluzione bloccante a ogni pozzetto.

■ LETTURA

Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm. Se si utilizza un lettore per micropiastre a doppia lunghezza d'onda, impostare la lunghezza d'onda dell'analisi a 450 nm e quella del riferimento a 620 nm.

- * La lettura va eseguita entro 20 minuti dal blocco della reazione.

* Prima di leggere la piastra, controllare che la sua parte inferiore sia pulita e asciutta e che non siano presenti bolle d'aria sulla superficie del liquido nei pozzetti.

■ CALCOLO DEI RISULTATI

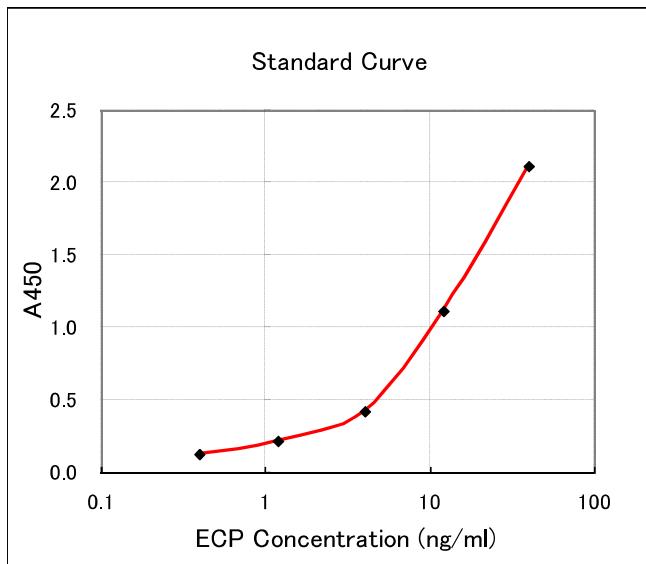
Calcolare il valore medio dell'assorbanza di tutti gli standard. Su carta millimetrata, costruire il grafico riportando questi dati rispetto alla concentrazione logaritmica degli standard. Da questa curva standard si possono così ricavare le concentrazioni dei campioni.

Se si utilizza un programma per il calcolo automatico della concentrazione, si raccomanda di utilizzare la curva che presenta il migliore adattamento dei dati.

Riportare la concentrazione della proteina ECP presente nei campioni moltiplicando il valore ricavato dalla curva standard per il fattore di diluizione (per es. x 5).

* Non è disponibile materiale di riferimento internazionale per la proteina ECP. Tale proteina è stata purificata e la sua concentrazione proteica è stata misurata mediante il metodo dell'assorbanza degli ultravioletti e il metodo di misurazione delle proteine.

■ ESEMPIO DI CURVA STANDARD



■ CONTROLLO DI QUALITÀ

Tutti i risultati delle analisi devono soddisfare i seguenti criteri.

A₄₅₀ dello Standard ECP 1: $\leq 0,2$

A₄₅₀ dello Standard ECP 6: $\geq 1,2$

I Controlli positivo e negativo devono dare i seguenti risultati:

Valore di ECP (ng/mL): come indicato nella relativa etichetta.

Se questi valori non sono soddisfatti, i risultati non sono da considerarsi validi e il test va ripetuto.

Prima di ripetere l'analisi, controllare i seguenti parametri.

- Temperatura di incubazione
- Tempo di incubazione
- Lavaggio

■ CONCENTRAZIONE DELLA PROTEINA ECP UMANA NEL SIERO UMANO NORMALE

I campioni di siero prelevato da donatori sani è stato analizzato mediante il MESACUP ECP TEST.

Sono stati misurati 148 sieri di donatori sani. Dopo aver escluso i campioni con valori superiori alla media + 3DS, è stata calcolata la nuova media + 3DS = 15,6 ng/mL.

Campione n = 148 media = 4,06 ng/mL DS = 3,86 media + 3DS = 15,6 ng/mL

■ LIMITI

Come per tutte le procedure dei test diagnostici, i risultati ottenuti con il MESACUP ECP TEST fungono solo da aiuto per la formulazione della diagnosi e non vanno interpretati come diagnostici di per sé.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

■ SENSIBILITÀ

L'A450 dello Standard ECP 1 (0 ng/mL) deve essere $\leq 0,2$

L'A450 dello Standard ECP 6 (40 ng/mL) deve essere $\geq 1,2$

■ SPECIFICITÀ

Quando si misurano campioni di controllo a concentrazione nota, nessun valore si deve discostare di $\pm 20\%$ rispetto alla concentrazione nota.

■ RIPRODUCIBILITÀ

Quando si misurano contemporaneamente 3 campioni di controllo a concentrazione nota per otto volte, il valore di CV% di ogni campione deve rientrare nel 15%.

■ SOSTANZE INTERFERENTI

Bilirubina F (fino a 18,3 mg/dL), bilirubina C (fino a 19,0 mg/dL), chilo (fino a 1.390 unità come formazina) e/o fattore reumatoide (fino a 500 UI/mL) non influenzano i risultati dell'analisi, tuttavia si consiglia di evitare l'uso di campioni altamente lipemici.

L'emoglobina non influisce sui risultati dell'analisi. Non utilizzare campioni emolizzati.

In seguito all'aggiunta di 500 ng/mL di EDN non sono stati riscontrati effetti sui valori dell'analisi.

■ INTERVALLO DI ANALISI

L'intervallo di analisi di questo kit è compreso tra 0,125 ng/mL e 40 ng/mL.

BIBLIOGRAFIA

1. Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150 (1986)
2. Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
3. Peterson, C., et al., Eur. J Haematol., 40, 415-423 (1988)
4. Zimmerman, B., et al., Clin Exp Allergy, 23, 564-570 (1993)

Türkçe

KULLANIM AMACI

MESACUP ECP TESTİ sandviç ELISA yöntemiyle serumdaki insan ECP'sini tespit etmek için bir kantitatif tahlil kitidir.

MESACUP ECP TESTİ yalnızca in vitro diagnostik kullanım içindir.

ÖZET VE AÇIKLAMA

Eozinofilik Katyonik protein (ECP), Eozinofilden türemiş Nörotoksin (EDN) ve Ana Temel Protein (MBP) aktifleşmiş eozinofillerden türeyen ana protein mediyatörleri olarak bilinir. ECP ve EDN eozinofillerdeki granüllerin matriksinde bulunurken MBP granüllerin çekirdeğinde bulunur. ECP ve EDN ribonükleaz A süperailesinin üyeleriidir. ECP ve MBP yüksek sitotoksiteye sahiptirler. Aktifleştirilmiş eozinofil, geç astıma bağlı tepki ve astıma bağlı hava yolu inflamasyonunda önemli bir rol oynar. ECP aktifleştirilmiş eozinofillerden saklandığı için, ECP eozinofil aktivasyonu ve degranülasyonunun bir işaret olabilir.

MESACUP ECP TESTİ, ELISA'da yüksek hassasiyetle spesifik olarak ECP'yi ölçmek içindir.

PRENSİPLER

MESACUP ECP TESTİ sandviç ELISA yöntemiyle insan ECP'sini ölçer.

Anti-insan ECP monoklonal antikorlarıyla kaplanmış kuyucuklarda ölçülecek örnekler vaya standartlar inkübe edilir. Yıkamadan sonra, bir peroksidaz konjugatlı anti-insan ECP poliklonal antikoru mikrokuyucuklara eklenir ve inkübe edilir. Başka bir yıkama adımdan sonra peroksidaz substrat mikrokuyucuklara eklenir ve ek bir süre için inkübe edilir. Asit solüsyonu daha sonra enzim reaksiyonunu sona erdirmek ve renk oluşumunu stabilize etmek için her kuyucuğa eklenir. Daha sonra her kuyucuğun optik yoğunluğu (O.D.) bir mikroplaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de ölçülür. ECP konsantrasyonu referans standartlarına dayanan bir standart eğri ile kalibre edilir.

KISACA TAHİL PROSEDÜRÜ

<Örnek inkübasyonu>	Mikro Kuyucuk plakasının her kuyucuğuna 100 µL seyreltilmiş örnekten (1:5) ekle
(20~25°C) 60 dk.	↓
<Yıkama>	Yıkama
	↓
<Konjugat inkübasyonu>	Her kuyucuğa 100 µL Konjugat reaktif ekle
(20~25°C) 60 dk.	↓
<Yıkama>	Yıkama
	↓
<Substrat inkübasyonu>	Her kuyucuğa 100 µL Substrat ekle
(20~25°C) 10 dk.	↓
<Tepkimeyi durdurma>	Her kuyucuğa 100 µL Durdurma solüsyonu ekle
	↓
	Emilimi oku (450 nm)

↓
Sonuçların Yorumlanması

REAKTİF VE DEPOLAMA

Malzemeler	Miktar (96 kuyucuk)
Anti-insan ECP monoklonal antikoru (fare) ile kaplanmış Mikrokuyucuk Şeritleri	8 kuyucuk x 12 şerit
ECP Standardı PBS, Rekombinant ECP, %0,09 sodyum azid, %1 Keçi Serumu Kullanıma hazır	1,3 mL x 6 flakon
Tahlil Seyrelticisi PBS, %0,09 sodyum azid, %1 Keçi Serumu Kullanıma hazır	50 mL x 1 flakon
Konjugat reaktifi Yabanturpu Peroksidaz Konjugatlı anti-insan ECP poliklonal antikoru (tavşan) %1 BSA Kullanıma hazır	15 mL x 1 flakon
Yıkama Konsantresi (20 x konsantrasyon) PBS, Tween 20	100 mL x 1 flakon
Substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin dihidroklorür / hidrojen peroksit (TMB/H ₂ O ₂) Kullanıma hazır	20 mL x 1 flakon
Durdurma solüsyonu 0,5 mol/L sülfürik asit Kullanıma hazır	20 mL x 1 flakon
Pozitif Kontrol PBS, Rekombinant ECP, %0,09 sodyum azid, %1 Keçi Serumu	1,3 mL x 1 flakon
Negatif Kontrol PBS, Rekombinant ECP, %0,09 sodyum azid, %1 Keçi Serumu	1,3 mL x 1 flakon

Açılmamış ve yeni açılmış kit bileşenleri 2-8°C sıcaklıkta etiketteki son kullanma tarihine kadar stabildir.

UYARILAR

- (1) Bu ürün sadece in vitro diagnostik amaçlı kullanım içindir. İnsanlar üzerinde kullanmayın.
- (2) Kit bileşenlerini belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın.
- (3) Numunelerle çalışırken ve testi yaparken tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük takın. Bittiğinde ellerinizi iyice yıkayın.
- (4) Reaktiflerin göz, cilt ve giysi ile temasından kaçının. Cilt üzerindeki reaktifler bol su ile yıkanarak uzaklaştırılmalıdır. TMB, tahriş edicidir ve Durdurma solüsyonu bir zehir ve aşındırıcı olan 0,5 mol/L sülfürik asitten oluşur.
- (5) ECP Standardı, Tahlil Seyrelticisi, Pozitif kontrol ve Negatif kontrol koruyucu olarak sodyum azid (%0,09) içerir ve dikkatli kullanılması gereklidir. Yutmayın, cilt veya yumuşak doku ile temasına fırsat tanımayın. Sodyum azid, tesisat sistemlerindeki bakır veya kurşun ile tepkimeye girerek patlayıcı metal azidler oluşturabilir. Bu sebeple sodyum azid içeren malzemeleri bir gidere dökerek

imha edeceğiniz zaman arkasından bol su dökün.

- (6) ECP Standardı, Tahvil Seyreltici, Konjugat reaktifi, Pozitif kontrol ve Negatif kontrol enfekte olmayan hayvanlardan alınan hayvansal kökenli malzemeler içerir. Bu bileşenler kullanılırken ve atılırken potansiyel olarak biyolojik tehlike taşıyan maddeler olarak işlenmelidir.
- (7) Diğer kitlerden reaktiflerle karıştırmayın.
- (8) Teste başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına ($20-25^{\circ}\text{C}$) getirilmelidir.
- (9) Kiti, test ve saklama sırasında direkt güneş ışığına maruz bırakmayın.
- (10) Reaktiflerin ve örneklerin mikrobiyal ve çapraz kontaminasyonundan kaçının.
TMB substrat solüsyonunun konjugat veya diğer oksidanlar ile kontaminasyonu, solüsyonun zamanından önce renk değiştirmesine neden olacaktır.
- (11) Normal oda sıcaklığının ($20-25^{\circ}\text{C}$) üstündeki veya altındaki inkübasyon sıcaklıkları, daha kısa veya daha uzun inkübasyon süreleri ve yanlış dilüsyonlar hatalı sonuçlara neden olabilir.
- (12) Kuyucuklar, yanlış pozitif sonuçları engellemek için Yıkama solüsyonuyla doğru şekilde yıkamalıdır.
- (13) Mikro kuyucuklar arasında çapraz kontaminasyonu engellemek için her örneği ve reaktifi dikkatle pipetleyin, köpüklemekten kaçının.
- (14) Tüm kullanılmamış mikro kuyucuk şeritleri, fermuarla kilitlenen keseye geri konulmalı ve bu kese de nem emiliminden kaçınmak için özenle geçirimsiz hale getirilmelidir.
Test prosedürü sırasında kuyucukların kurumasına izin vermeyin.
- (15) Yıkama konsantresi $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de bulanıklaşabilir, bu tutarsız sonuçlara neden olmaz.
Yıkama Solüsyonunu hazırlarken Yıkama Konsantresini tam olarak çözün.
- (16) Test için kullanılan malzemeler atılmalıdır veya aşağıda gösterildiği şekilde işlenmelidir.
1 saatte fazla %2 nihai kons. glutaraldehid solüsyonunda bekletin, 1 saatte fazla %0,1 sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletin (mevcut klorin: yaklaşık 1,000 ppm) veya 20 dakikadan fazla bir süre 121°C 'de otoklav uygulayın.
- (17) Bu testten elde edilen sonuçlar yalnızca tanıda yardımcıdır. Her hekim bu sonuçları hastanın öyküsü, fizik bulguları ve diğer tanı prosedürlerinin ışığında yorumlamalıdır.
- (18) Koruyucu ambalajın hasar görmesi durumunda, kit bileşenleri her ülkenin ilgili talimatlarına ve düzenlemelerine uygun olarak işlenmeli veya atılmalıdır.

GEREKLİ OLAN ANCAK TEMİN EDİLMEYEN MALZEMELER

- Mikroplaka okuyucu (dalga boyu: 450 nm, 620 nm/referans)
- Çok kanallı mikropipet (örn. $100 \mu\text{L} - 300 \mu\text{L}$)
- Tek kanallı mikropipet (örn. $10 \mu\text{L} & 100 \mu\text{L}$)
- Otomatik yıkayıcı veya yıkama şışesi
- İyonsuzlaştırılmış veya damıtılmış su
- Yıkama solüsyonunun hazırlanması için bir litre dereceli silindir
- Hasta örneğini seyreltmek için test tüpleri (örn. $1000 \mu\text{L}$)
- Tek kullanımlık pipet başlıklarını
- Kağıt havlu
- Mikroplaka kapağı

PROSEDÜR

■ REAKTİF HAZIRLANMASI

- 1) Kullanmadan önce tüm test materyallerini oda sıcaklığına ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$) getirin.
- 2) Mikro kuyucuk şeritleri: Keseden gerekli mikro kuyucuk şeritlerini çıkarın ve onları çerçeveye koyun. Kullanılmamış şeritleri derhal soğuk depoya yerleştirin.
- 3) Yıkama Solüsyonu: Yıkama Konsantresi kullanımdan önce seyreltilmelidir. Yıkama konsantresini 900 mL damıtılmış suya 100 mL konsantre ekleyerek 1:10 oranında seyreltin. Seyreltilmiş Yıkama solüsyonu, $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ 'de 2 hafta boyunca stabildir.
- 4) ECP Standardı, Örnek seyreltici, Konjugat reaktifi, Substrat ve Durdurma solüsyonu'nu seyreltmeyin. Bu reaktifler kullanıma hazırlıdır.

■ KONTROLLERİN HAZIRLANMASI

Kontrollerin seyreltilmesi

Pozitif kontrol ve Negatif kontrolü, Tahlil seyreltici ile 1:5 oranında seyreltin.

Örneğin, 200 μL Tahlil Seyrelticiye 50 μL Kontrol ekleyin.

* Saklanamamaları nedeniyle örnekleri her test için seyreltin.

■ ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

1) Örnekleme

ECP'nin serum seviyeleri örneklemeden sonra *in vitro* etkisi sebebiyle değişebilir. Koagülasyon esnasında ECP'nin eozinofillerden *in vitro* bırakılması ihtiyalî vardır. Bu sebeple her laboratuarın kendi örnekleme prosedürüni oluşturması önerilir. Aşağıdaki örnekleme prosedürü daha önce bildirilmiştir.

ECP ölçümü için kan Boşaylı SST tüpüne alınmıştır (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, N.J., USA). Kan, oda sıcaklığında tam olarak 60 dakika boyunca pihtlaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra serum $1200 \times g$ 'de 10 dakika santrifüjleme ile ayrılmış ve ardından yeni bir test tüpüne aktarılmış ve analizler gerçekleştirilene kadar -20°C 'de saklanmıştır.

2) Örneğin seyreltilmesi (İnsan serumu)

Her örneği Tahlil Seyreltici ile 1:5 oranında seyreltin.

Örneğin, 200 μL Tahlil Seyrelticiye 50 μL Örnek ekleyin.

* Saklanamamaları nedeniyle örnekleri her test için seyreltin.

3) Saklama

Taze hasta serumu kullanın. Örnekler alındıktan sonra olabildiğince çabuk test edilmelidir.

Örnekler -20°C veya daha düşük sıcaklıkta saklanmalıdır. Dondurma ve çözürme işlemlerini tekrarlamayın.

■ TEST PROSEDÜRÜ

ADIM 1. (ÖRNEK İNKÜBASYONU)

100 μL ECP Standardı, seyreltilmiş her örnek, Pozitif kontrol ve Negatif kontrolü çok kanallı bir mikropipet ile uygun mikro kuyuculkara yerleştirin. (ECP Standardını seyreltmeyin.)

* İnkübasyon mikro kuyuculkara pipetlendiği anda başlar. Bu nedenle pipetleme işlemi mümkün olduğunda çabuk tamamlanmalıdır.

Kuyucukları bir mikroplaka kapağıyla kapatın ve oda sıcaklığında (20-25°C) 60 dakika inkübe edin.

ADIM 2. (YIKAMA)

Kuyucuk içeriğini emdirin veya atın. Kuyucuğu yıkama solüsyonuyla doldurun ve daha sonra içeriği tamamen emdirin veya atın. 4 kere yıkayın. Kalan Yıkama solüsyonunu ortadan kaldırınmak için plakayı bir kağıt havlu üzerine hafifçe vurun. Otomatik yıkayıcı kullanılıyorsa 4 kere yıkayın.

* Her laboratuarın kendi uygun yıkama süreleri ve diğer durumlarını belirlemesi önerilir.

* Yıkama solüsyonu, 20-25°C'de kullanılmalıdır.

ADIM 3. (KONJUGAT İNKÜBASYONU)

Çok kanallı bir mikro pipet ile her kuyucuğa 100 µL Konjugat reaktifi ekleyin.

Kuyucukları bir mikro plaka kapak ile kapatın ve oda sıcaklığında (20-25°C) 60 dakika inkübe edin.

* Konjugat reaktifini bir kere flakondan çıkardıktan sonra geri koymayın.

ADIM 4. (YIKAMA)

Mikroplakayı ADIM 2'de anlatıldığı gibi yıkayın.

ADIM 5. (SUBSTRAT İNKÜBASYONU)

Çok kanallı bir mikro pipet ile her kuyucuğa 100 µL Substrat ekleyin.

* Substrati bir kere flakondan çıkardıktan sonra geri koymayın.

Kuyucukları mikroplaka kapağıyla kapatın ve oda sıcaklığında (20-25°C) 10 dakika inkübe edin.

ADIM 6. (TEPKİMEYİ DURDURMA)

Çok kanallı bir mikro pipet ile her kuyucuğa 100 µL Durdurma solüsyonu ekleyin.

■ OKUMA

Her kuyucuğun 450 nm'de emilimini okuyun. Eğer bir çift dalga boyu plaka okuyucu kullanılıyorsa, test dalga boyunu 450 nm'ye ve referansı 620 nm'ye ayarlayın.

* Okuma reaksiyonun durmasından sonraki 20 dakika içerisinde yapılmalıdır.

* Plakayı okumadan önce plakanın altının temiz ve kuru olduğuna ve kuyucuklardaki sıvının yüzeyinde hava kabarcıkları olmadığına emin olun.

■ SONUÇLARIN HESAPLANMASI

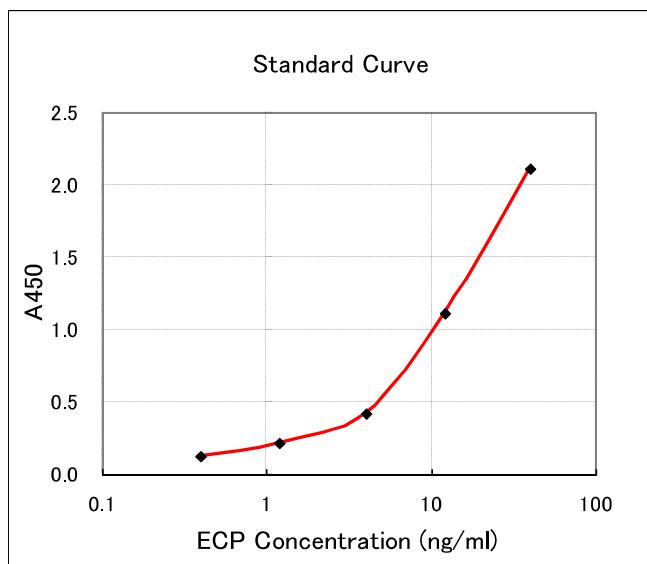
Her standartın ortalama emilim değerlerini hesaplayın ve kayıtlı standart konsantrasyonuna karşı uygun grafik kağıdı üzerine çizin. Örneklerin konsantrasyonu artık standart eğri üzerinden okunabilir.

Eğer konsantrasyonu otomatik olarak hesaplamak için bir program kullanıyorsanız, en iyi uyan eğrinin kullanılması önerilir.

Örneklerin ECP konsantrasyonunu standart eğimden okunan değeri seyreltme faktörüyle çarparak kaydedin (örn. x 5).

*ECP için uluslararası bir referans materyal bulunmamaktadır. ECP saflaştırılmış ve protein konsantrasyonu Ultraviyole emilim metodu ve protein ölçümü metodu ile ölçülmüştür.

■ STANDART EĞRİ ÖRNEĞİ



■ KALİTE KONTROL

Her test sonucu, aşağıdaki kriterleri karşılamalıdır.

ECP Standardı 1 A₄₅₀: $\leq 0,2$

ECP Standardı 6 A₄₅₀: $\geq 1,2$

Pozitif ve Negatif kontroller aşağıdaki sonuçları vermelidir:

ECP Değeri (ng/mL): Her etikette açıklandığı gibi.

Bu kriterlerin herhangi birine uyulmadığında sonuç yanlıştır ve test tekrarlanmalıdır.

Testi tekrarlamadan önce aşağıdaki noktalara dikkat edin.

- İnkübasyon Sıcaklığı
- İnkübasyon Süresi
- Yıkama

■ NORMAL İNSAN SERUMUNDA İNSAN ECP'Sİ KONSANTRASYONU

Sağlıklı kan bağışçılarının serum örnekleri MESACUP ECP TESTİ tarafından tahlil edilmiştir.

148 sağlıklı bağışçı serumu ölçülmüştür. Bu örneklerin ölçümü ortalama + 3SD'den çıkarıldıkten sonra yeni ortalama + 3SD bu şekilde belirlenmiştir: ortalama + 3SD = 15,6 ng/mL.

Örnek n = 148 ortalama = 4,06 ng/mL SD = 3,86 ortalama+3SD = 15,6 ng/mL

■ SINIRLAMALAR

Diger tanı amaçlı test prosedürleri gibi MESACUP ECP TESTİ ile elde edilen sonuçlar yalnızca tanıya yardımcı olarak işe yarar ve tek başlarına tanı olarak yorumlanmamalıdır.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

■ HASSASİYET

ECP Standardı 1 A₄₅₀'si (0 ng/mL) \leq 0,2 olmalıdır

ECP Standardı 6 A₄₅₀'si (40 ng/mL) \geq 1,2 olmalıdır

■ ÖZGÜNLÜK

Bilinen konsantrasyonların kontrol örneklerini ölçümlerken her değer bilinen konsantrasyonun $\pm\%20$ aralığında olmalıdır.

■ YENİDEN ÜRETİLEBİLİRLİK

Bilinen konsantrasyonların 3 kontrol örneğini aynı anda sekizli olarak ölçümlerken, her örneğin %CV'si %15 içinde olmalıdır.

■ TEST SONUÇLARINI ETKİLEYEBİLECEK MADDELER

Bilirubin F (18,3 mg/dL'ye kadar), Bilirubin C (19,0 mg/dL'ye kadar), kilüs (Formazin olarak 1,390 üniteye kadar) ve/veya Romatoid faktör (500 IU/mL'ye kadar) sonucu engellemez, ancak yüksek hemolizli veya yüksek lipemik örnekler kullanmaktan kaçının.

Hemoglobin tahlil sonucunu etkiler. Hemolize örnekler kullanmayın.

500 ng/mL'ye kadar EDN eklenmesinin tahlil sonuçlarına etkisi görülmemiştir.

■ TEST ARALIĞI

Bu kitin test aralığı 0,125 ng/mL - 40 ng/mL'dir.

KAYNAKCA

1. Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150 (1986)
2. Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
3. Peterson, C., et al., Eur. J Haematol., 40, 415-423 (1988)
4. Zimmerman, B., et al., Clin Exp Allergy, 23, 564-570 (1993)

** The following symbols are used on the label.
** Symboles utilisés sur les étiquettes
** Die folgenden Symbole finden Sie auf dem Etikett.
** En las etiquetas se usan los siguientes símbolos
** I seguenti simboli sono usati sulle etichette.
** Os símbolos seguintes são usados no rótulo.
** Följande symboler används på etiketten.
** Τα κάτωθι σύμβολα χρησιμοποιούνται στην επικέτα
** Etikette aşağıdaki semboller kullanılmıştır.



For in vitro diagnostic use
Uniquement destiné à un usage in vitro
Für in-vitro Diagnostik
Para uso diagnóstico in vitro
Per uso diagnostico in vitro
Para diagnóstico *in vitro*
För in vitro-diagnostisk användning
Για in vitro διαγνωστική χρήση
In vitro diagnostik kullanım için



Catalogue number
Référence
Artikelnummer
Número de catálogo
Número di catalogo
Número de catálogo
Katalognummer
Αριθμός καταλόγου
Katalog numarası



Lot
Lot
Charge
Lote
Lotto
Lote
Lot
Πλατίδας
Lot



96 tests
96 tests
96 Bestimmungen
96 test
96 tests
96 testes
96 tester
96 εξετάσεις
96 test



See instructions for use
Consulter le mode d'emploi
Siehe Packungsbeilage
Ver instrucciones de uso
Vedi Istruzioni per l'uso
Ver instruções de utilização
Se bruksanvisningen
Δείτε τις οδηγίες χρήσης
Kullanım talimatlarına bakın



See instructions for use available on the website
Consulter le mode d'emploi disponible sur le site Web.
Siehe Gebrauchsanweisung erhältlich auf Website
Consulte las instrucciones de uso disponibles en la pagina Web
Consulti le istruzioni per l'uso disponibili sul sito web
Ver instruções de utilização disponíveis no sitio Web
Se bruksanvisningen tillgänglig på webbsidan
Δείτε τις οδηγίες χρήσης που διατίθενται στον ιστότοπο
Kullanım talimatlarını web sayfamızdan edinebilirsiniz



See instructions for use available per telephone
Consulter le mode d'emploi disponible au téléphone.
Siehe Gebrauchsanweisung erhältlich per Telefon
Consulte las instrucciones de uso disponibles telefónicamente
Consulti le istruzioni per l'uso disponibili telefonicamente
Consultar as instruções de utilização disponíveis por telefone
Se bruksanvisningen tillgänglig via telefon
Δείτε τις οδηγίες χρήσης που διατίθενται ανά τηλέφωνο
Kullanım talimatlarını telefon yoluyla edinebilirsiniz



Use by
Utiliser jusqu'en
Haltbarkeit
Temperatura de uso
Uso da
Utilizar até
Utgångsdatum
Να χρησιμοποιηθεί έως
Son kullanma tarihi



Store at 2 – 8°C
Conserver entre 2 et 8°C
Lagerung bei 2 – 8°C
Conservar a 2 – 8°C
Conservare a 2 – 8°C
Armazenar a 2 – 8°C
Förvaras i 2 - 8 °C
Φύλαξη στους 2-8 °C
2 – 8°C sıcaklıkta saklayın



Manufactured by
Fabricant
Hersteller
Fabricado por
Prodotto da
Produzido por
Tillverkad av
Παρασκευαστηκε από^ü
Üretici:



Authorized representative
Représentant européen autorisé
Bevollmächtigter
Representante Autorizado
Rappresentante Autorizzato
Representante Autorizado
Auktoriserad representant
Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος
Yetkili Temsilci

<ELISA Components>

MICROWELL

Microwell strips
Micro plaque
Mikrotiterstreifen
Tiras de micropocillos
Strips di micropozzetti
Microplacas
Mikrobrunnstrips
Ταινίες βυθισμάτων
Mikrokuyucuk şeritleri

STD 1

Standard sera
Sérum Calibrateur 1
Standardserum
Suero Estandar
Sieri standard
Soro Padrão
Standardserum
Πρότυποι Οροί Καμπύλης
Standart serum

CONJ-HRP

Conjugate reagent
Conjugué (prêt à l'emploi)
Konjugatreagenz
Reactivo conjugado
Conjugato
Reagente conjugado
Konjugat
Αντιδραστήριο συζεύγματος
Konjugat reaktifi

ASSAY DIL

Assay diluent
Diluant sérum
Probendiluent
Diluyente de ensayo
Diluente del test
Diluente
Analysbuffert
Διαλύτης ανάλυσης
Tahlil seyreltici

WASH CONC | 10x

Wash concentrate (10x)
Solution de lavage (10x)
Waschkonzentrat (10x)
Solución de lavado concentrada (10x)
Soluzione di lavaggio concentrata (10x)
Solução de lavagem concentrada (10x)
Tvättkoncentrat (10x)
Συμπυκνωμένο πλυστικό 10 x
Yıkama konsantresi (10x)

SUBS

Substrate
Substrat
Substrat
Sustrato
Substrato
Substrato
Substrat
Υπόστρωμα
Substrat

STOP SOLN

Stop solution
Solution d'arrêt
Stopplösung
Solución de parada
Soluzione bloccante
Solução de paragem
Stopplösning
Διάλυμα διακοπής αντίδρασης
Durdurma solüsyonu

CONTROL +

Positive control
Contrôle positif
Positivkontrolle
Control positivo
Controllo positivo
Controlo positivo
Positiv kontroll
Θετικό πρότυπο ελέγχου
Pozitif kontrol

CONTROL -

Negative control
Contrôle négatif
Negativkontrolle
Control negativo
Controllo negativo
Controlo negativo
Negativ kontroll
Αρνητικό πρότυπο ελέγχου
Negatif kontrol

Manufactured by:

Fabriqué par:

Hersteller:

Fabricado por:

Prodotto da:

Produzido por:

Tillverkad av:

Παρασκευάστηκε από:

Üretici:

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

KDX Nagoya Sakae Bldg. 10F

4-5-3 Sakae, Naka-Ku, Nagoya, Aichi, 460-0008 JAPAN

Tel: +81 52-238-1901

Fax: +81 52-238-1440

Authorized Representative in the EU:

Mandataire dans la Communauté européenne:

Bevollmächtigter in der EU:

Representante autorizado en EU:

Rappresentante Autorizzato per l'Unione Europea:

Representante Autorizado na UE:

Auktoriserad representant i EU:

Εξουσιοδοτημένος Αντιπρόσωπος στην ΕΕ:

AB Yetkili Temsilcisi:

QARAD b.v.b.a.

Cipalstraat 3, B-2440 Geel, BELGIUM



www.e-labeling.eu/MBL009309



+800 135 79 135
GR 00800 161 2205 7799
TR 00800 142 064 866

Revision:

November 27, 2014

27/11/2014

No. 7618E-4

