

## Instructions for Use

# Neopterin ELISA

IVD



REF EIA-2949



96



Distributed by:



**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION .....	3
3	TEST PRINCIPLE .....	3
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
5	STORAGE AND STABILITY .....	4
6	SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE.....	4
7	MATERIALS SUPPLIED .....	4
8	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	5
9	PROCEDURE NOTES .....	5
10	PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS.....	5
11	TEST PROCEDURE .....	6
12	QUALITY CONTROL .....	6
13	CALCULATION OF RESULTS.....	6
14	INTERPRETATION OF RESULTS.....	7
15	EXPECTED VALUES.....	7
16	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
17	PERFORMANCE .....	8
1	ZWECKBESTIMMUNG .....	9
2	KLINISCHE BEDEUTUNG .....	9
3	TESTPRINZIP .....	9
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN .....	10
5	LAGERUNG UND HALTBARKEIT .....	10
6	PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.....	10
7	KOMPONENTEN DES KITS .....	11
8	ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN) .....	11
9	HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG .....	11
10	TESTVORBEREITUNGEN .....	12
11	TESTDURCHFÜHRUNG .....	12
12	QUALITÄTSKONTROLLE.....	13
13	TESTAUSWERTUNG .....	13
14	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE .....	14
15	NORMWERTE .....	14
16	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	15
17	TESTCHARAKTERISTIKA.....	15

---

1	USO PREVISTO .....	16
2	SOMMARIO E SPIEGAZIONI .....	16
3	PRINCIPIO DEL TEST .....	16
4	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	17
5	CONSERVAZIONE E STABILITÀ.....	17
6	PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI .....	17
7	MATERIALE FORNITO .....	18
8	MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI .....	18
9	NOTE PER LA PROCEDURA.....	18
10	ISTRUZIONI PRE-TEST .....	19
11	PROCEDURA DEL TEST .....	19
12	CONTROLLO DI QUALITÀ .....	20
13	CALCOLO DEI RISULTATI .....	20
14	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI .....	21
15	VALORI ATTESI.....	21
16	LIMITI DELLA PROCEDURA.....	22
17	PERFORMANCE .....	22
18	REFERENCES/LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....	23
	SYMBOLS USED .....	24

## 1 INTENDED USE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of neopterin in human serum, plasma and urine.

## 2 SUMMARY AND EXPLANATION

Neopterin is a low molecular weight molecule belonging to the chemical group known as pteridines. It is synthesised by cellular immune reaction of macrophages and dendritic cells upon stimulation with the cytokine interferon-g and as a consequence released. Neopterin has a higher stability in body fluids which makes the sample handling and measurement easier compared to other cytokines. The low molecular weight, let neopterin molecules rapidly pass the intravasal area, where it is released in urine after glomerular filtration. The half-life period in human bodies is only affected by renal excretion. So neopterin values reflect the totality of immunological processes for monocytes/macrophages and dendritic cells and can be seen as a general marker of immune activity. This characteristic feature of neopterin to reflect the different interactions of immunocompetent cells is the basis for the extraordinary status of measuring neopterin in immunological diagnosis. As a non-invasive method, urinary neopterin to creatinine ratio determination is also helpful in monitoring disease progression and the effects of therapies, as well.

Neopterin biosynthesis is closely associated with activation of the cellular immune system. Increased concentrations of neopterin were reported in patients with viral infections, suggesting that increased values may originate from the immune response of patients directed against virally infected cells. It was shown that antigenic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells leads to neopterin release into cell culture medium and that human macrophages produce neopterin in vitro when stimulated by interferon gamma.

The determination of neopterin levels in human body fluids offers a useful and innovative tool to monitor diseases associated with the activation of cell-mediated immunity.

Increasing neopterin levels in various infections precede the clinical manifestation and seroconversion.

Normally samples are not tested for all possible infections. Therefore, the measurement of neopterin in blood donor samples is a useful tool in order to reduce the risk of infections via blood transfusion.

Other diagnostic applications for the determination of neopterin are:

- follow-up of traumatized ICU patients
- use as prognostic indication in HIV infections and malignant diseases
- early indication of complications in allograft recipients
- indication of disease activity in autoimmune diseases
- diagnosis of viral infections
- differential diagnosis of acute viral and bacterial infections
- diagnosis of tumour diseases
- follow-up control of chronic infections and monitoring of immunostimulatory therapy

## 3 TEST PRINCIPLE

Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the basic principle of a competitive ELISA. An unknown amount of antigen in the sample and a fixed amount of enzyme labelled antigen compete for the antibody-binding sites (rabbit-anti-neopterin). Both antigen-antibody complexes bind to the wells of the microtiter strips coated with a goat-anti-rabbit antibody. Unbound antigen is removed by washing. The intensity of the color developed after the substrate incubation is inversely proportional to the amount of antigen in the sample. Results of samples can be determined directly using the standard curve.

## 4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. In case of severe damage of the kit package please contact DRG or your supplier in written form, latest one week after receiving the kit. Do not use damaged components in test runs, but keep safe for complaint related issues.
4. Obey lot number and expiry date. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
5. Follow good laboratory practice and safety guidelines. Wear lab coats, disposable latex gloves and protective glasses where necessary.
6. Reagents of this kit containing hazardous material may cause eye and skin irritations. See MATERIALS SUPPLIED and labels for details. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request.
7. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
8. The cleaning staff should be guided by the professionals regarding potential hazards and handling.
9. Avoid contact with Stop solution. It may cause skin irritations and burns.

10. All reagents of this kit containing human serum or plasma have been tested and were found negative for HIV I/II, HBsAg and HCV. However, a presence of these or other infectious agents cannot be excluded absolutely. For this reason reagents should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

## 5 STORAGE AND STABILITY

The kit is shipped at ambient temperature and should be stored at 2 °C - 8 °C. Keep away from heat or direct sunlight. The storage and stability of specimens and prepared reagents is stated in the corresponding chapters.

The microtiter strips are stable up to the indicated expiry after the kit is opened. Make sure that the opened bag is tightly closed when stored at 2 °C - 8 °C.

## 6 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

### Serum, Plasma (EDTA)

The usual precautions for venipuncture should be observed. It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use grossly hemolytic, icteric or grossly lipemic specimens. Do not use specimens containing NaN<sub>3</sub>. Samples appearing turbid should be centrifuged before testing to remove any particulate material.

Storage:	2 °C - 8 °C	≤ -20 °C (Aliquots)	Keep away from heat or direct sunlight. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Stability:	72 hours	6 months	

### Urine

It is possible to use spontaneous as well as 24 h urine. The total volume of urine excreted during a 24 h period should be collected and mixed in a single bottle. Preservation is not necessary. Determine total volume for calculation of results. **Mix and centrifuge samples before use in the assay.**

Storage:	2 °C - 8 °C	≤ -20 °C (Aliquots)	Keep away from heat or direct sunlight. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Stability:	72 hours	6 months	

## 7 MATERIALS SUPPLIED

Quantity	Symbol	Component
1 x 12 x 8	<b>MTP</b>	<b>Microtiter Plate</b> Break apart strips. Coated with anti-rabbit IgG (goat, polyclonal).
1 x 8 mL	<b>ANTISERUM</b>	<b>Neopterin Antiserum</b> Ready to use. Contains: Antiserum (rabbit), phosphate buffer, stabilizers.
1 x 13 mL	<b>ENZCONJ</b>	<b>Enzyme Conjugate</b> , Ready to use. Contains: Neopterin, conjugated to peroxidase, phosphate buffer, stabilizers. <b>Store protected from light.</b>
1 x 6 x 1.5 mL	<b>CAL A-F</b>	<b>Standard A-F</b> 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 nmol/L Ready to use. Contains: Neopterin, phosphate buffer, stabilizers.
1 x 2 x 1.5 mL	<b>CONTROL 1+2</b>	<b>Control 1+2</b> Ready to use. Concentrations / acceptable ranges see QC certificate.
1 x 21 mL	<b>ASSAYBUF</b>	<b>Assay Buffer</b> Ready to use. Contains: phosphate buffer, BSA, stabilizers.
1 x 50 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	<b>Wash Buffer, Concentrate (20x)</b> Contains: Tween, stabilizers.
1 x 19 mL	<b>TMB SUBS</b>	<b>TMB Substrate Solution</b> , Ready to use Contains: TMB, Buffer, stabilizers.
1 x 19 mL	<b>TMB STOP</b>	<b>TMB Stop Solution</b> Ready to use 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
1 x	<b>FOIL</b>	<b>Adhesive Foil</b>

**8 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**

1. Micropipettes (Multipette Eppendorf or similar devices, < 3% CV). Volumes: 10; 50; 100; 1000 µL
2. Vortex mixer
3. Orbital shaker (500 rpm)
4. 8-Channel Micropipettor with reagent reservoirs
5. Additional Assay Buffer for urine dilution (can be ordered separately from DRG under REF KENO751).
6. Wash bottle, automated or semi-automated microtiter plate washing system
7. Microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (reference wavelength 600-650 nm)
8. Bidistilled or deionised water
9. Paper towels, pipette tips and timer

**9 PROCEDURE NOTES**

1. Any improper handling of samples or modification of the test procedure may influence the results. The indicated pipetting volumes, incubation times, temperatures and pretreatment steps have to be performed strictly according to the instructions. Use calibrated pipettes and devices only.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time. Allow all reagents and specimens to reach room temperature (18 °C - 25 °C) and gently swirl each vial of liquid reagent and sample before use. Mix reagents without foaming.
3. Avoid contamination of reagents, pipettes and wells/tubes. Use new disposable plastic pipette tips for each component and specimen. Do not interchange caps. Always cap not used vials. Do not reuse wells/tubes or reagents.
4. It is advised to determine samples in duplicate to be able to identify potential pipetting errors.
5. Use a pipetting scheme to verify an appropriate plate layout.
6. Incubation time affects results. All wells should be handled in the same order and time sequences. It is recommended to use an 8-channel Micropipettor for pipetting of solutions in all wells.
7. Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Buffer, and that there are no residues in the wells.
8. Humidity affects the coated wells/tubes. Do not open the pouch until it reaches room temperature. Unused wells/tubes should be returned immediately to the resealed pouch including the desiccant.

**10 PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS****10.1 Preparation of concentrated components**

 The contents of the kit for 96 determinations can be divided into 3 separate runs.


**The volumes stated below are for one run with 4 strips (32 determinations).**

Dilute/dissolve	Component	Diluent		Relation	Storage	Stability
15 mL	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">WASHBUF</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONC</span>	285 mL	bidist. water	1:20	2 °C - 8 °C	1 month

**10.2 Dilution of Samples**

Sample	to be diluted	with	Relation	Remarks
Serum, Plasma	no			Avoid direct sunlight.
Urine	generally	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ASSAYBUF</span>	1:101	e.g. 10 µL + 1000 µL Avoid direct sunlight.

Samples containing concentrations higher than the highest standard have to be diluted further.

 Samples from patients treated with ATG (anti-T lymphocyte globulin from rabbit) after transplantation will cause erroneous high results. This effect can be avoided by a pre-incubation of the samples:

Pipette 100 µL of serum into a polystyrene or glass tube and add 200 µL of Assay Buffer. Close tubes (use pierced stopper for glass tubes) and incubate for 10 min in a water bath at 95 °C - 100 °C.

Vortex and withdraw 20 µL of the resulting suspension for the assay.

Results have to be multiplied 3-fold.

**11 TEST PROCEDURE**

1. Pipette **20 µL** of each **Standard, Control, serum, plasma and diluted urine sample** into the respective wells of the Microtiter Plate.
2. Pipette **100 µL** of **Enzyme Conjugate** into each well.
3. Pipette **50 µL** of **Neopterin Antiserum** into each well.
4. Cover plate with black adhesive foil. **Incubate 90 min** at **RT (18 °C - 25 °C)** on an orbital shaker (500 rpm) **in the dark**.
5. Remove adhesive foil. Discard incubation solution. Wash plate **4 x** with **300 µL** diluted **Wash Buffer**. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
6. For adding of Substrate and Stop Solution use, if available, an 8-channel Micropipettor. Pipetting should be carried out in the same time intervals for Substrate and Stop Solution. Use positive displacement and avoid formation of air bubbles.
7. Pipette **150 µL** of **TMB Substrate Solution** into each well.
8. **Incubate 10 min** at **RT (18 °C - 25 °C)**.
9. Stop the substrate reaction by adding **150 µL** of **TMB Stop Solution** into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate.
10. **Measure** optical density with a photometer at **450 nm** (Reference-wavelength: 600-650 nm) within **15 min**.

**12 QUALITY CONTROL**

The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or comparable standards/laws. User and/or laboratory must have a validated system to get diagnosis according to GLP. All kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the labels and the QC certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls. It is recommended to participate at appropriate quality assessment trials.

In case of any deviation the following technical issues should be proven: Expiration dates of (prepared) reagents, storage conditions, pipettes, devices, incubation conditions and washing methods.

**13 CALCULATION OF RESULTS**

The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic graph paper or using an automated method. A good fit is provided with cubic spline, 4 Parameter Logistics or Logit-Log.

For the calculation of the standard curve, apply each signal of the standards (one obvious outlier of duplicates might be omitted and the more plausible single value might be used).

The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.

Due to the dilution of urine samples the urine values obtained have to be multiplied by the factor 101.

Samples showing concentrations above the highest standard have to be diluted as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS and reassayed.

Conversion:

Based on the molecular weight of Neopterin (MW: 253.2 g/mol) and Creatinine (MW: 113.1 g/mol) a calculation in different units can be made as follows:

Serum/Plasma:

Neopterin	$(\text{nmol/L}) \times 0.253 = (\text{ng/mL})$
	$(\text{ng/mL}) / 0.253 = (\text{nmol/L})$

Urine:

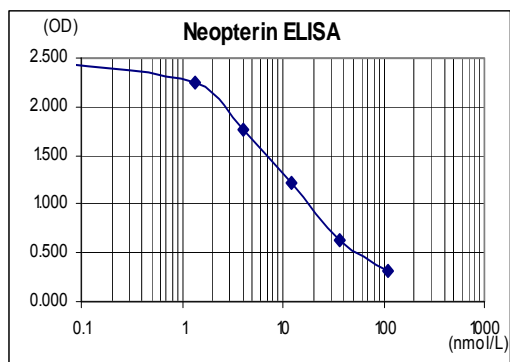
Usually neopterin in urine is correlated to creatinine (which has to be analyzed by separate method) and expressed in neopterin to creatinine -ratio (UNCR) in µmol neopterin/mol creatinine:

Creatinine	$(\text{mg/dL}) \times 88.4 = (\mu\text{mol/L})$
	$(\mu\text{mol/L}) / 1000 = (\text{mmol/L})$
	$(\text{mmol/L}) / 1000 = (\text{mol/L})$
Neopterin	$(\text{nmol/L}) / 1000 = (\mu\text{mol/L})$

**Typical Calibration Curve**

(Example. Do not use for calculation!)

Standard	Neopterin (nmol/L)	OD <sub>Mean</sub>	OD/OD <sub>max</sub>
A	0.00	2.449	100
B	1.35	2.238	91
C	4.00	1.772	72
D	12.0	1.209	49
E	37.0	0.634	26
F	111	0.325	13



**14 INTERPRETATION OF RESULTS**

Neopterin (Serum)	Interpretation
< 10 nmol/L	normal
> 10 nmol/L	elevated

The results themselves should not be the only reason for any therapeutical consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

**15 EXPECTED VALUES**

Apparently healthy subjects show the following values:

Serum		Serum				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)
nmol/L	ng/mL	Age	Sex	Neopterin nmol/L		
< 10	< 2.5			Mean	upper limit	
		0 - 18	♂, ♀	6.78	13.5	
		19 - 75	♂, ♀	5.34	8.7	
		> 75	♂, ♀	9.67	19.0	

Urine				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)
Age	Sex	µmol Neopterin/mol Creatinine		
		Mean	upper limit	
1 - 4	♂, ♀	267	432	
4 - 7	♂, ♀	226	405	
7 - 12	♂, ♀	181	374	
12 - 15	♂, ♀	171	343	
15 - 18	♂, ♀	144	320	
	♂	123	195	
18 - 25	♀	128	208	
	♂	101	182	
26 - 35	♀	124	209	
	♂	109	176	
36 - 45	♀	140	239	
	♂	105	197	
46 - 55	♀	147	229	
	♂	119	218	
56 - 65	♀	156	249	
	♂	133	229	
> 65	♀	151	251	

It is recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.



**16 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

Specimen collection and storage have a significant effect on the test results. See SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE for details.

For cross-reactivities, see PERFORMANCE.

The following blood components do not have a significant effect ( $\pm 20\%$  of expected) on the test results up to the below stated concentrations:

Hemoglobin	5.0 mg/mL
Bilirubin	2.5 mg/mL
Triglyceride	45.5 mg/mL

**Do not use samples containing sodium azide** since these samples lead to erroneous high results.

Samples from patients who were treated with ATG (anti-T lymphocyte globulin from rabbit) after transplantation will cause erroneous high results. This effect can be avoided by a pre-incubation of the samples as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS.

**17 PERFORMANCE**

<b>Analytical Specificity (Cross-reactivity)</b>	Substance	Cross-Reactivity (%)		Cross-reactivity of other substances tested < 0.05 %
	7,8-Dihydro-Neopterin	2.0		
	5,6,7,8-Tetrahydro-Neopterin	< 0.44		
	D-Monapterin	< 0.17		
	L-Monapterin	< 0.03		
	L-Biopterin	< 0.01		
	7,8-Dihydro-L-Biopterin	< 0.03		
<b>Analytical Sensitivity (Limit of Detection)</b>	0.7 nmol/L	Mean signal (Zero-Standard) - 2SD		
<b>Precision</b>		Range (nmol/L)	CV (%)	
Intra-Assay	Serum	3.1 - 43	4.3 - 11.7	
	Urine	932 - 5112	5.3 - 11.2	
Inter-Assay	Serum	4.67 - 29.98	8.8 - 13.8	
	Urine	2616 - 4419	9.3 - 14.4	
<b>Linearity</b>		Range (nmol/L)	Range (%)	Serial dilution up to
	Serum	1.8 - 51.5	91 - 114	1:16
	Urine	234 - 3622	87 - 120	1:8
<b>Recovery</b>		Mean (%)	Range (%)	% Recovery after spiking
	Serum	99	81 - 116	
	Urine	94	84 - 117	
<b>Method Comparison versus HPLC</b>	Serum	DRG-Assay = 1.18 x HPLC + 0.44		r = 0.92; n = 111
	Urine	DRG-Assay = 1.17 x HPLC - 13.52		r = 0.99; n = 27

## 1 ZWECKBESTIMMUNG

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Neopterin in humanem Serum, Plasma und Urin.

## 2 KLINISCHE BEDEUTUNG

Neopterin ist eine niedermolekulare Pteridinverbindung, die während der zellulären Immunreaktion von Makrophagen und dendritischen Zellen durch das Zytokin Interferon-g induziert und daraufhin sezerniert wird. Neopterin ist in Körperflüssigkeiten biologisch inert, was die Probenbehandlung und die Genauigkeit der Messung im Gegensatz zu den meisten Zytokinen entscheidend vereinfacht. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes gelangt Neopterin schnell in den Intravasalraum, wird glomerulär filtriert und im Urin ausgeschieden. Seine Halbwertszeit im menschlichen Organismus wird nur von seiner renalen Ausscheidung bestimmt. Der Neopterinwert spiegelt die Summe der immunologischen Einflüsse auf die Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen wider und gilt somit als genereller Marker der Immunaktivierung. Die Erfassung dieser vielfältigen Wechselwirkungen zwischen immunkompetenten Zellen ist auch die Basis für den besonderen Stellenwert der Neopterinbestimmung in der immunologischen Diagnostik. Als eine nichtinvasive Methode ist die Messung von Neopterin im Urin im Verhältnis zum Kreatiningehalt zudem bei einer Reihe von Krankheitsverläufen bzw. Therapiekontrollen einsetzbar.

Bei Infektionen, besonders viraler und parasitärer Genese, steigt Neopterin schon in der Frühphase noch vor dem Auftreten spezifischer Antikörper an. Infektionen durch extrazelluläre Bakterien führen nur bei chronischem bzw. lebensbedrohlichem Verlauf (Sepsis) zu erhöhten Neopterinspiegeln, während durch intrazellulär lebende Bakterien bedingte Infektionen meist schon im akuten Stadium mit einer Erhöhung von Neopterin einhergehen.

Ein wichtiger Einsatzbereich des Neopterin-Tests ist das Blutspender-Screening zur Herabsetzung des Infektionsrisikos durch Bluttransfusionen. Neopterin ist hier gerade durch seine Unspezifität ein sinnvoller Marker, da Spenderblut nicht routinemäßig auf alle Infektionskrankheiten wie z. B. Zytomegalie, Toxoplasmose oder Hepatitis A untersucht werden kann. Außerdem kann durch die Neopterinbestimmung das sogenannte diagnostische Fenster, welches zwischen dem Zeitpunkt des Erregereintritts und der Antikörperbildung liegt, weiter verkleinert werden. So kommt dem Neopterin auch beim Ausschluss von HIV- oder Hepatitis-Infektionen eine wichtige Bedeutung zu.

Weitere Anwendungsbereiche sind:

- Verlaufskontrolle bei Traumapatienten auf Intensivstationen
- Prognosestellung bei HIV-Infektionen
- Verlaufskontrolle nach Organtransplantationen
- Aktivitätsmarker bei Autoimmunerkrankungen
- Prognosestellung bei viralen Infektionen
- Unterscheidung viraler von bakteriellen Infektionen
- Prognosestellung bei Tumorerkrankungen
- Verlaufskontrolle bei chronischen Infektionen und Monitoring bei immunstimulierender Therapie

## 3 TESTPRINZIP

Der Neopterin ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur direkten quantitativen Bestimmung von Neopterin in humanem Serum und Urin. In den mit Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern beschichteten Mikrotiterstreifen werden die Proben, Kontrollen und die Standards mit Peroxidase markiertem Neopterin und für Neopterin spezifischem Antiserum vom Kaninchen gemischt. Das unmarkierte Antigen verdrängt einen Teil des markierten Antigens von den Bindungsstellen am anti-Neopterin-Antikörper. Der anti-Neopterin-Antikörper wird von den am Mikrotiterstreifen fixierten anti-Kaninchen-Antikörpern gebunden. Durch einen Waschschriff werden die freien von den gebundenen Antigenen getrennt. Die nach der anschließenden Substratreaktion bei 450 nm gemessene optische Dichte (OD) ist umgekehrt proportional zur Neopterin-Konzentration. Die unbekanntenen Proben werden anhand der Standardkurve ausgewertet.

**4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Nur zum In-vitro-Gebrauch. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
2. Vor der Testdurchführung sollte die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist DRG bzw. der jeweilige Lieferant innerhalb einer Woche nach Empfang der Ware schriftlich zu benachrichtigen. Beschädigte Komponenten dürfen nicht zur Testdurchführung verwendet werden, sondern sollten solange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden endgültig geregelt ist.
4. Chargen-Nummer und Verfallsdatum beachten. Es dürfen keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen in einem Test verwendet werden. Verfallene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
5. Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten. Je nach Bedarf sollten Laborkittel, Einmal-Latexhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden.
6. Reagenzien dieses Kits, die Gefahrstoffe enthalten, können Reizungen der Augen und der Haut hervorrufen. Siehe Angaben in KOMPONENTEN DES KITS und auf den Etiketten. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage erhältlich.
7. Chemikalien und vorbereitete oder gebrauchte Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
8. Das Reinigungspersonal ist durch das Fachpersonal bezüglich möglicher Gefahren und Umgang anzuleiten.
9. Kontakt mit Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verätzungen hervorrufen.
10. Alle Reagenzien dieses Kits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, ergaben bei der Prüfung auf anti-HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

**5 LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur angeliefert und sollte bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Hinweise zur Lagerung und Haltbarkeit der Proben und vorbereiteten Reagenzien sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

Die Mikrotiterplatte ist auch nach dem Öffnen der Verpackung bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar, wenn der Beutel sorgfältig wieder verschlossen und bei 2 °C - 8 °C gelagert wird.

**6 PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG**

**Serum, Plasma (EDTA):** Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutabnahme sind einzuhalten. Die chemische Integrität der Blutproben muss vom Zeitpunkt der Blutabnahme bis zur Testdurchführung erhalten bleiben. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Getrübte Proben sollten vor der Testdurchführung zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Lagerung:	2 °C - 8 °C	≤ -20 °C (aliquotiert)	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	72 Stunden	6 Monate	

**Urin:** Spontanurin oder 24 h-Sammelurin können verwendet werden. Das Gesamtvolumen über 24 h sollte in einer Flasche gesammelt und gemischt werden. Eine Konservierung ist nicht erforderlich. Gesamtvolumen bestimmen zur späteren Auswertung des Tests. **Proben vor Gebrauch mischen und zentrifugieren.**

Lagerung:	2 °C - 8 °C	≤ -20 °C (aliquotiert)	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	72 Stunden	6 Monate	

**7 KOMPONENTEN DES KITS**

Anzahl / Menge	Symbol	Komponente
1 x 12 x 8	<b>MTP</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> Streifen einzeln abbrechbar. Beschichtet mit anti-Kaninchen IgG (Ziege, polyklonal).
1 x 8 mL	<b>ANTISERUM</b>	<b>Neopterin Antiserum</b> Gebrauchsfertig. Enthält: Antiserum (Kaninchen), Phosphatpuffer, Stabilisatoren.
1 x 13 mL	<b>ENZCONJ</b>	<b>Enzymkonjugat</b> Gebrauchsfertig. Enthält: Neopterin, konjugiert mit Peroxidase, Phosphatpuffer, Stabilisatoren. <b>Vor Licht geschützt lagern.</b>
1 x 6 x 1.5 mL	<b>CAL A-F</b>	<b>Standard A-F</b> 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 nmol/L Gebrauchsfertig. Enthält: Neopterin, Phosphatpuffer, Stabilisatoren.
1 x 2 x 1.5 mL	<b>CONTROL 1+2</b>	<b>Kontrolle 1+2</b> Gebrauchsfertig. Konzentrationen / Akzeptanzbereiche siehe QC-Zertifikat.
1 x 21 mL	<b>ASSAYBUF</b>	<b>Assaypuffer</b> Gebrauchsfertig. Enthält: Phosphatpuffer, BSA, Stabilisatoren.
1 x 50 mL	<b>WASHBUF CONC</b>	<b>Waschpuffer Konzentrat (20x)</b> Enthält: Tween, Stabilisatoren.
1 x 19 mL	<b>TMB SUBS</b>	<b>TMB Substratlösung</b> Enthält: TMB, Puffer, Stabilisatoren.
1 x 19 mL	<b>TMB STOP</b>	<b>TMB Stopplösung</b> Gebrauchsfertig. 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
1 x	<b>FOIL</b>	<b>Haftklebefolie</b>

**8 ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)**

- Pipetten (Multipette Eppendorf oder vergleichbare Produkte, < 3% VK). Volumina: 10; 50; 100; 1000 µL
- Vortex-Mischer
- Orbitalschüttler (500 rpm)
- 8-Kanal Mikropipette mit Reagenziengefäßen
- Zusätzlicher Assaypuffer zur Urinverdünnung (kann separat bei DRG unter **REF** KENO751 bestellt werden).
- Waschflasche, automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
- Messgerät für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 600-650 nm)
- Bidest. oder deionisiertes Wasser
- Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

**9 HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG**

- Fehler bei der Handhabung der Proben oder Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung können die Ergebnisse verfälschen. Die angegebenen Pipettierolumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte sind unbedingt gemäß Arbeitsanleitung einzuhalten. Nur kalibrierte Pipetten und Geräte verwenden.
- Sobald mit der Testdurchführung begonnen wird, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden. Es ist sicherzustellen, dass alle benötigten Reagenzien, Geräte und Hilfsmittel zur rechten Zeit zur Verfügung stehen. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) gebracht und vor Gebrauch vorsichtig ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Kontaminationen der Reagenzien, Pipetten und Wells/Röhrchen sind zu vermeiden. Neue Einmal-Pipettenspitzen für jede zu pipettierende Komponente und jede Probe verwenden. Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen. Nicht benötigte Fläschchen immer verschlossen halten. Wells/Röhrchen oder Reagenzien dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen, um eventuelle Pipettierfehler zu erkennen.
- Es sollte ein Pipettierschema verwendet werden um die Identifikation der Standards und Proben auf der Platte sicherzustellen.
- Die Inkubationszeiten beeinflussen die Ergebnisse. Bei jedem Pipettierschritt sollten alle Wells in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeittakt behandelt werden. Die Verwendung einer 8-Kanal-Mikropipette zum Pipettieren in alle Wells wird empfohlen.
- Die korrekte Durchführung der Waschschrte ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette oder eines automatischen Waschsystems für Mikrotiterplatten

wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.

8. Feuchtigkeit beeinflusst die beschichteten Wells/Röhrchen. Verpackung nicht öffnen bevor Raumtemperatur erreicht ist. Nicht benötigte Wells/Röhrchen sofort in den wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel zurückgeben.

## 10 TESTVORBEREITUNGEN

### 10.1 Vorbereitung konzentrierter Komponenten



Der Inhalt des Kits für 96 Bestimmungen kann in 3 Läufe aufgeteilt werden.

Die unten angegebenen Volumina sind für einen Lauf mit 4 Streifen (32 Bestimmungen).

Verd./rekonst.	Komponente	Diluent		Verhältnis	Lagerung	Haltbarkeit
15 mL	WASHBUF CONC	285 mL	bidest. Wasser	1:20	2 °C - 8 °C	1 Monat

### 10.2 Probenverdünnung

Probe	zu verdünnen	mit	Verhältnis	Bemerkungen
Serum / Plasma	nein			Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.
Urin	immer	ASSAYBUF	1:101	z.B. 10 µL + 1000 µL Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.

Proben mit Konzentrationen über dem höchsten Standard müssen weiter verdünnt werden.



Proben von Transplantationspatienten, die mit ATG (anti-human T-Lymphozytenglobulin vom Kaninchen) behandelt werden, führen zu falsch-hohen Ergebnissen. Dieser Effekt kann durch die folgende Vorbehandlung der Proben vermieden werden:

100 µL Serum in ein Polystyrol- oder Glasröhrchen pipettieren und 200 µL Assaypuffer zugeben. Röhrchen zuschrauben, Glasröhrchen mit durchbohrtem Stopfen verschließen und 10 Minuten im Wasserbad bei 95 °C - 100 °C erhitzen. Anschließend vortexen und 20 µL im Assay einsetzen.

Der aus der Standardkurve ermittelte Wert ist mit 3 zu multiplizieren.

## 11 TESTDURCHFÜHRUNG

- 20 µL von jedem **Standard**, jeder **Kontrolle**, **Serum-**, **Plasma-** und verdünnten **Urinproben** in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettieren.
- Je **100 µL Enzymkonjugat** in jedes Well pipettieren.
- Je **50 µL Neopterin Antiserum** in jedes Well pipettieren.
- Platte mit **schwarzer** Haftklebefolie abdecken. **90 min** bei **RT (18 °C - 25 °C)** auf einem Orbitalschüttler (500 rpm) im **Dunkeln inkubieren**.
- Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte **4 x** mit **300 µL** verdünntem **Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
- Substrat- und Stopplösung möglichst mit einer 8-Kanal-Pipette pipettieren und Substrat- und Stopplösung in denselben Zeitintervallen zugeben. Mit positivem Vorhub pipettieren, um die Bildung von Luftbläschen zu vermeiden.
- Je **150 µL TMB Substratlösung** in jedes Well pipettieren.
- 10 min** bei **RT (18 °C - 25 °C) inkubieren**.
- Die Substratreaktion durch Zugabe von je **150 µL TMB Stopplösung** in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln.
- Die Optische Dichte mit einem Photometer bei **450 nm** (Referenzwellenlänge: 600-650 nm) innerhalb von **15 min messen**.

## 12 QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn der Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung abgearbeitet wurde. Ferner muss der Anwender die GLP-Regeln (Good Laboratory Practice) oder vergleichbare Normen/Gesetze beachten. Anwender und/oder Labor müssen zur Diagnosestellung ein gemäß GLP validiertes System verwenden. Alle Kit-Kontrollen müssen innerhalb der Akzeptanzbereiche, die auf den Etiketten und dem QC-Zertifikat angegeben sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Ergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden. Jedes Labor sollte darüber hinaus eigene bekannte Proben als weitere Kontrollen mitführen. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Bei Abweichungen sind die folgenden Fehlermöglichkeiten zu überprüfen: Haltbarkeit der (vorbereiteten) Reagenzien, Lagerungsbedingungen, Pipetten, Geräte und Hilfsmittel, Inkubationsbedingungen und Waschmethoden

## 13 TESTAUSWERTUNG

Die erhaltenen OD der Standards (y-Achse, linear) gegen deren Konzentration (x-Achse, logarithmisch) auftragen, entweder auf semi-logarithmischem Papier oder durch ein entsprechendes Computerprogramm. Bei Verwendung eines Computerprogramms werden die Cubic-Spline-Methode, 4-Parameter-Analyse (lin-log) oder Logit-Log-Berechnung empfohlen.

Zur Berechnung der Standardkurve sollten alle Werte der Standards verwendet werden (bei Doppelwerten kann ein offensichtlicher Ausreißerwert eliminiert und stattdessen der plausible Einzelwert verwendet werden).

Die Konzentrationen der Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Wegen der Verdünnung der Urinproben im Assay müssen die erhaltenen Urinwerte mit dem Faktor 101 multipliziert werden, um die Konzentration zu erhalten.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen werden, müssen wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben verdünnt und erneut analysiert werden.

### Umrechnung:

Wird eine Umrechnung in anderen Einheiten gewünscht, lassen sich die Konzentrationen basierend auf den Molekulargewichten für Neopterin (MG: 253.2 g/mol) und Kreatinin (MG: 113.1 g/mol) folgendermaßen umrechnen:

Serum/Plasma:

Neopterin	$(\text{nmol/L}) \times 0.253 = (\text{ng/mL})$
	$(\text{ng/mL}) / 0.253 = (\text{nmol/L})$

Urin:

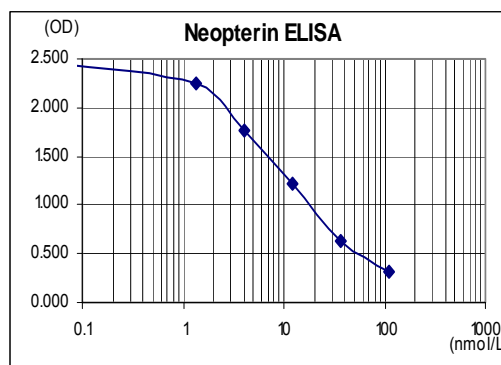
Der Neopterinwert in Urin wird üblicherweise auf Kreatinin bezogen, welches gesondert zu bestimmen ist und dann als Neopterin/Kreatinin-Ratio in  $\mu\text{mol}$  Neopterin/mol Kreatinin angegeben wird:

Kreatinin	$(\text{mg/dL}) \times 88.4 = (\mu\text{mol/L})$
	$(\mu\text{mol/L}) / 1000 = (\text{mmol/L})$
	$(\text{mmol/L}) / 1000 = (\text{mol/L})$
Neopterin	$(\text{nmol/L}) / 1000 = (\mu\text{mol/L})$

### Typische Standardkurve

(Beispiel. Nicht zur Testauswertung verwenden!)

Standard	Neopterin (nmol/L)	OD <sub>Mittelwert</sub>	OD/OD <sub>max</sub>
A	0.00	2.449	100
B	1.35	2.238	91
C	4.00	1.772	72
D	12.0	1.209	49
E	37.0	0.634	26
F	111	0.325	13



**14 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Neopterin (Serum)	Interpretation
< 10 nmol/L	normal
> 10 nmol/L	erhöht

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein aufgrund der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern nur unter Berücksichtigung aller klinischen Beobachtungen und weiterer diagnostischer Mittel.

**15 NORMWERTE**

Augenscheinlich gesunde Spender zeigten die folgenden Normwerte:

Serum		Serum/Plasma			(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)	
nmol/L	ng/mL	Alter	Geschlecht	Neopterin nmol/L		
< 10	< 2.5			Mittelwert		obere Grenze
		0-18	♂, ♀	6.78		13.5
		19-75	♂, ♀	5.34	8.7	
		> 75	♂, ♀	9.67	19.0	

Urin				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)
Alter	Geschlecht	µmol Neopterin/mol Kreatinin		
		Mittelwert	obere Grenze	
1-4	♂, ♀	267	432	
4-7	♂, ♀	226	405	
7-12	♂, ♀	181	374	
12-15	♂, ♀	171	343	
15-18	♂	144	320	
	♀	123	195	
18-25	♂	128	208	
	♀	101	182	
26-35	♂	124	209	
	♀	109	176	
36-45	♂	140	239	
	♀	105	197	
46-55	♂	147	229	
	♀	119	218	
56-65	♂	156	249	
	♀	133	229	
>65	♂	151	251	
	♀			

Jedes Labor sollte unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten eigene Normalwertbereiche erstellen.

**16 GRENZEN DES VERFAHRENS**

Die korrekte Durchführung der Probengewinnung und Aufbewahrung ist entscheidend für die Testergebnisse. Näheres siehe PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.

Angaben zu Kreuzreaktivitäten sind im Kapitel TESTCHARAKTERISTIKA zu finden.

Die folgenden Blutbestandteile haben bis zu der angegebenen Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse ( $\pm 20\%$ ):

Hämoglobin	5.0 mg/mL
Bilirubin	2.5 mg/mL
Triglyceride	45.5 mg/mL

**Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden**, da diese zu falsch hohen Ergebnissen führen können.

Proben von Patienten, die mit ATG (anti-T Lymphozytenglobulin vom Kaninchen) nach einer Transplantation behandelt wurden, zeigen falsch hohe Ergebnisse. Dieser Effekt kann durch eine Vorinkubation der Proben, wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben, vermieden werden.

**17 TESTCHARAKTERISTIKA**

<b>Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)</b>	Substanz		Kreuzreaktivität (%)		Kreuzreaktivität aller anderen getesteten Substanzen < 0.05 %
	7,8-Dihydro-Neopterin		2.0		
	5,6,7,8-Tetrahydro-Neopterin		< 0.44		
	D-Monapterin		< 0.17		
	L-Monapterin		< 0.03		
	L-Biopterin		< 0.01		
7,8-Dihydro-L-Biopterin		< 0.03			
<b>Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)</b>	0.7 nmol/L	Mittleres Signal (Nullstandard) - 2SD			
<b>Präzision</b>		Bereich (nmol/L)	VK (%)		
<b>Intra-Assay</b>	Serum	3.1 - 43	4.3 - 11.7		
	Urin	932 - 5112	5.3 - 11.2		
<b>Inter-Assay</b>	Serum	4.67 - 29.98	8.8 - 13.8		
	Urin	2616 - 4419	9.3 - 14.4		
<b>Linearität</b>		Bereich (nmol/L)	Bereich (%)	Höchste Verdünnungsstufe	
	Serum	1.8 - 51.5	91 - 114	1:16	
	Urin	234 - 3622	87 - 120	1:8	
<b>Wiederfindung</b>		Mittelwert (%)	Bereich (%)	% Wiederfindung nach Spiken	
	Serum	99	81 - 116		
	Urin	94	84 - 117		
<b>Methodenvergleich versus HPLC</b>	Serum	DRG-Assay = 1.18 x HPLC + 0.44		r = 0.92; n = 111	
	Urin	DRG-Assay = 1.17 x HPLC - 13.52		r = 0.99; n = 27	



## 1 USO PREVISTO

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di neopterin in siero, plasma e urina umana.

## 2 SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La Neopterin è una molecola a basso peso molecolare che fa parte del gruppo chimico conosciuto sotto il nome di pteridine. È sintetizzata da una reazione cellulare immunitaria di macrofagi e cellule dendritiche su stimolazione da parte del citochina interferone- $\gamma$  e rilasciata di conseguenza. La neopterin ha una stabilità elevata nei fluidi corporei, il che rende la manipolazione e la misurazione dei campioni più semplice rispetto alle altre citochine. Il basso peso molecolare permette alle molecole di neopterin di oltrepassare rapidamente l'area intravasale, dove questa è rilasciata sotto forma di urina dopo la filtrazione glomerulare. L'emivita negli organismi umani è influenzata esclusivamente dall'escrezione renale. I valori della neopterin riflettono quindi la totalità dei processi immunologici per monociti/macrofagi e cellule dendritiche e si possono considerare un marcatore generico dell'attività immunitaria. Questa particolare caratteristica della Neopterin di riflettere le varie interazioni tra cellule immunocompetenti costituisce il motivo di base della condizione straordinaria per cui, nella diagnosi immunologica, si procede alla misurazione della Neopterin. Essendo un metodo non invasivo, la determinazione del rapporto neopterin urinaria/creatinina è altrettanto utile nel monitoraggio dell'evoluzione delle patologie e degli effetti delle terapie.

La biosintesi della neopterin è strettamente associata all'attivazione del sistema immunitario cellulare. Un aumento delle concentrazioni di neopterin è stato rilevato in pazienti con infezioni virali, il che suggerisce che un aumento dei valori può derivare dalla risposta immunitaria di pazienti diretta contro cellule infettate da virus. Si è dimostrato che la stimolazione con antigeni di cellule mononucleate del sangue periferico umano porta al rilascio di neopterin nel mezzo di coltura cellulare e che i macrofagi umani producono neopterin in vitro se stimolati da gamma interferone.

La determinazione dei livelli di neopterin nei fluidi dell'organismo umano offre uno strumento utile ed innovativo per monitorare patologie associate all'attivazione di immunità mediata da cellule.

Un aumento dei valori della neopterin precede, in varie infezioni, la loro manifestazione clinica e sierconversione. Normalmente, i campioni normalmente non vengono testati per tutte le infezioni possibili. La misurazione della neopterin in campioni di donatori di sangue è quindi uno strumento utile per ridurre il rischio d'infezioni mediante trasfusioni del sangue.

Ulteriori applicazioni diagnostiche per la determinazione della neopterin sono:

- Follow-up di pazienti ICU traumatizzati
- Indicatore di prognosi in infezioni HIV e patologie maligne
- Indicazione precoce di complicazioni in riceventi di allograft
- Indicatore dell'attività della patologia in patologie autoimmuni
- Diagnosi d'infezioni virali
- Diagnosi differenziale d'infezioni virali e batteriche acute
- Diagnosi di malattie tumorali
- Controlli durante il follow-up d'infezioni croniche e monitoraggio di terapia immunostimolante

## 3 PRINCIPIO DEL TEST

Saggio immunoassorbente legato a enzima su fase solida (ELISA) basato sul principio dell'ELISA competitiva. Una quantità sconosciuta di antigene presente nel campione e una quantità fissa di anticorpo marcato con un enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo (anti-neopterin di coniglio). Il complesso antigene-anticorpo coniugato alla perossidasi si lega alle pareti della micropiastra che sono rivestite con un anticorpo di capra anti-coniglio. L'antigene non legato viene rimosso tramite lavaggio. L'intensità del colore sviluppatosi dopo l'incubazione con il substrato è inversamente proporzionale alla quantità di antigene nel campione. I risultati dei campioni possono essere determinati direttamente utilizzando la curva di riferimento.

#### 4 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Solo per uso *diagnostico in-vitro*. Solo per uso professionale.
2. Leggere attentamente le istruzioni prima di iniziare il test. Utilizzare il manuale fornito nel kit. Assicurarsi di aver compreso tutte le indicazioni.
3. In caso di danneggiamento del kit contattare DRG o il Vostro fornitore entro 1 settimana dal ricevimento della merce. Non utilizzare i componenti danneggiati ma conservarli per fornire prove del danno assieme al reclamo che inoltrere al produttore/fornitore.
4. Rispettare lotto e scadenze. Non scambiare o mescolare tra loro reagenti di lotti diversi. Non usare i reagenti scaduti.
5. Attenersi alle Buone Pratiche di Laboratorio e alle direttive di sicurezza. Indossare camici, guanti in lattice e occhiali protettivi se necessario.
6. Alcuni reagenti del kit contengono sostanze pericolose che potrebbero causare irritazioni a pelle ed occhi. Consultare la sezione MATERIALE FORNITO e le etichette per i dettagli precisi. Schede di sicurezza del prodotto sono disponibili su richiesta specifica.
7. I reagenti preparati e usati e le sostanze chimiche del kit devono essere trattati come rifiuti pericolosi secondo le normative di sicurezza e la legislazione vigente nel Paese in cui il prodotto viene usato.
8. Il personale delle pulizie dev'essere informato dal personale specializzato sui possibili rischi e sulle procedure da adottare.
9. Evitare il contatto con la soluzione stop. Può causare irritazioni e ustioni della pelle.
10. Tutti i reagenti del kit contenenti siero umano o plasma sono risultati negativi rispetto a HIV I/II, HBsAg e HCV. Si raccomanda tuttavia di trattarli come potenzialmente pericolosi poiché non si può escludere in maniera assoluta la presenza di questi o di altri agenti infettivi.

#### 5 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il kit è spedito e trasportato a temperatura ambiente e deve essere conservato a 2 °C - 8 °C. Non esporre a luce solare diretta e ad alte temperature. Le informazioni relative a conservazione e stabilità di tutti i reagenti e dei campioni sono riportate nel capitolo corrispondente.

La piastra microtitrata aperta è stabile fino a scadenza del kit se conservata nel suo involucro ben chiuso riposta a 2 °C - 8 °C.

#### 6 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

##### Siero, Plasma (EDTA)

Osservare le classiche precauzioni durante il prelievo venoso. Conservare l'integrità del campione di sangue dal momento del prelievo al momento dell'esecuzione del test. Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici. Non usare campioni che contengono NaN<sub>3</sub>. I campioni torbidi devono essere centrifugati per rimuovere il materiale particolato al loro interno.

Conservazione:	2 °C - 8 °C	≤ -20 °C (Aliquote)	Non esporre alla luce solare diretta e al calore. Evitare la ripetizione di cicli di congelamento/scongelo.
Stabilità:	72 ore	6 mesi	

##### Urina

È possibile usare campioni freschi e campioni delle 24 ore. Il volume totale delle urine delle 24 ore deve essere raccolto in un unico recipiente. Non sono necessari conservanti. Segnare il volume totale per il calcolo dei risultati. **Mescolare e centrifugare i campioni prima di usare nel saggio.**

Conservazione:	2 °C - 8 °C	≤ -20 °C (Aliquote)	Non esporre alla luce solare diretta e al calore. Evitare la ripetizione di cicli di congelamento/scongelo.
Stabilità:	72 ore	6 mesi	

**7 MATERIALE FORNITO**

Quantità	Simbolo	Componente
1 x 12 x 8	<b>MTP</b>	<b>Micropiastra</b> Strisce separabili. Coniugato con anti-coniglio IgG (capra, policlonale).
1 x 8 mL	<b>ANTISERUM</b>	<b>Neopterin Antisiero</b> Pronto/a all'uso. Contiene: Antisiero (coniglio), tampone fosfato, stabilizzatori.
1 x 13 mL	<b>ENZCONJ</b>	<b>Coniugato Enzimatico</b> Pronto/a all'uso. Contiene: Neopterin, coniugato a perossidase, tampone fosfato, stabilizzatori. <b>Conservare a riparo dalla luce.</b>
1 x 6 x 1.5 mL	<b>CAL A-F</b>	<b>Standard A-F</b> 0; 1.35; 4.0; 12.0; 37.0; 111 nmol/L Pronto/a all'uso. Contiene: Neopterin, tampone fosfato, stabilizzatori.
1 x 2 x 1.5 mL	<b>CONTROL 1+2</b>	<b>Controllo 1+2</b> Pronto/a all'uso. Per le concentrazioni /gli intervalli accettabili vedere le etichette sulle provette.
1 x 21 mL	<b>ASSAYBUF</b>	<b>Tampone Saggio</b> Pronto/a all'uso. Contiene: tampone fosfato, BSA, stabilizzatori.
1 x 50 mL	<b>WASHBUF</b> <b>CONC</b>	<b>Tampone Lavaggio Concentrato (20x)</b> Contiene: Tween, stabilizzatori.
1 x 19 mL	<b>TMB SUBS</b>	<b>Soluzione Substrato TMB</b> Contiene: TMB, Tampone, stabilizzatori.
1 x 19 mL	<b>TMB STOP</b>	<b>Soluzione Stop TMB</b> Pronto/a all'uso. 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .
1 x	<b>FOIL</b>	<b>Pellicola Adesiva</b>

**8 MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

1. Micropipette (Multipette Eppendorf o similari, < 3 % CV). Volumi: 10; 50; 100; 1000 µL
2. Vortex mixer
3. Agitatore orbitale (500 rpm)
4. Micropipetta 8-Canali con contenitori per reagenti
5. Tampone Saggio addizionale per la diluizione del urina (si può ordinare separatamente dall'IBL al **REF** KENO751).
6. Spruzzetta per lavaggi, lavatore per micropiastre automatico o semi automatico
7. Lettore per micropiastre in grado di leggere ad assorbanza di 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 600-650 nm)
8. Acqua bidistillata o deionizzata
9. Carta assorbente, puntali per pipette e timer

**9 NOTE PER LA PROCEDURA**

1. Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica alla procedura può compromettere i risultati. Rispettare rigorosamente i volumi, i tempi e le temperature di incubazione e i passaggi di pretrattamento dei campioni indicati in metodica. Utilizzare pipette calibrate.
2. Una volta iniziato il test completare tutti i passaggi senza interruzioni. Assicurarsi che tutti i reagenti siano stati precedentemente preparati in tempo utile. Far raggiungere la temperatura ambiente ai campioni e ai componenti del kit (18 °C - 25 °C) e mescolare delicatamente ciascun reattivo liquido e campione prima dell'uso. Non creare schiuma durante il mescolamento.
3. evitare la contaminazione di reagenti, pipette, pozzetti o provette. Usare puntali di plastica nuovi per ogni reagente, standard e campione. Non scambiare i tappi tra loro. Tappare sempre i flaconi non utilizzati. Non riutilizzare pozzetti/provette o reagenti.
4. Si consiglia di saggiare i campioni in doppio per poter identificare eventuali errori di pipettamento.
5. Usare uno schema di pipettamento per realizzare un'appropriata distribuzione sulla piastra.
6. Il tempo d'incubazione influisce sui risultati. Tutti i pozzetti dovrebbero essere dispensati nello stesso ordine e sequenza temporale. Si raccomanda una pipetta multicanale a 8 canali per pipettare le soluzioni in tutti i pozzetti.
7. Il lavaggio della micropiastra è importante. Pozzetti lavati in modo inappropriato possono portare a risultati erranei. Si raccomanda una pipetta multicanale o un lavatore automatico per piastre. Non far asciugare i pozzetti tra le varie incubazioni. Non graffiare i pozzetti rivestiti durante risciacqui e aspirazioni. Risciacquare e versare i reagenti con cura. Durante i risciacqui assicurarsi che i pozzetti siano ben riempiti con la soluzione di lavaggio e che non ci siano residui nei pozzetti.

8. L'umidità influisce sui pozzetti/tubi rivestiti. Non aprire l'involucro finché non ha raggiunto la temperatura ambiente. Riporre immediatamente i tubi/pozzetti non utilizzati nell'involucro con il dissecante.

## 10 ISTRUZIONI PRE-TEST

### 10.1 Preparazione di componenti concentrati



Il contenuto del kit per 96 determinazioni può essere diviso per 3 esecuzioni separate.

**I volumi indicati di seguito si riferiscono a un'esecuzione con 4 strisce (32 determinazioni).**

Diluire / dissolvere	Componente	Diluyente		Rapporto	Conservazione	Stabilità
15 mL	WASHBUF CONC	285 mL	acqua bidist.	1:20	2 °C - 8 °C	1 mese

### 10.2 Diluizione dei Campioni

Campione	da diluire	con	Rapporto	Note
Siero, Plasma	non			Evitare la luce solare diretta.
Urina	sempre	ASSAYBUF	1:101	p.e. 10 µL + 1000 µL Evitare la luce solare diretta.

Campioni con concentrazioni superiori allo standard più alto devono essere ulteriormente diluiti.

campioni di pazienti che dopo un trapianto sono stati trattati con ATG (globulina anti-linfocita T di coniglio) daranno risultati erroneamente alti. Questo effetto può essere evitato con una preincubazione dei campioni:

Pipettare 100 µL di siero in una provetta di polistirene o di vetro e aggiungere 200 µL di Soluzione Tampone. Chiudere le provette (utilizzare un tappo forato per le provette di vetro) e incubare per 10 minuti in un bagno d'acqua a 95 °C a 100 °C. Agitare energicamente e rimuovere 20 µL della sospensione risultante per il saggio.

I risultati devono essere moltiplicati per 3.

## 11 PROCEDURA DEL TEST

- Pipettare **20 µL** di **Standard, Controlli, campione di soro, plasma e campione di urina diluito** rispettivi pozzetti della Micropiastra.
- Pipettare **100 µL** di **Coniugato Enzimatico** in ogni pozzetto.
- Pipettare **50 µL** di **Neopterin Antisiero** in ogni pozzetto.
- Coprire la piastra con pellicola adesiva nera. **Incubare 90 min a TA (18 °C - 25 °C)** su un oscillatore orbitale (500 rpm) nel buio.
- Rimuovere la pellicola adesiva. Eliminare la soluzione d'incubazione. Lavare la piastra **4 x** con **300 µL** di **Tampone Lavaggio** diluito. Rimuovere l'eccesso di soluzione picchiettando la piastra capovolta su una salvietta di carta.
- Per aggiungere le Soluzioni Substrato e Stop usare, possibilmente, una micropipetta 8-canali. Pipettare con intervalli di tempo costanti per le Soluzioni Stop e Substrato. Usare uno spostamento positivo ed evitare la formazione di bolle d'aria.
- Pipettare **150 µL** di **Tampone Substrato** in ogni pozzetto.
- Incubare per 10 min a TA (18 °C - 25 °C).**
- Fermare la reazione substrato aggiungendo **150 µL** di **Soluzione Stop TMB** in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente il contenuto agitando leggermente la piastra.
- Misurare** la densità ottica con un fotometro a **450 nm** (Lunghezza d'onda di riferimento: 600-650 nm) entro **15 min.**

## 12 CONTROLLO DI QUALITÀ

I risultati del test sono validi solo se il test è stato eseguito seguendo le istruzioni per l'uso. L'utente deve inoltre attenersi rigorosamente ai principi della BPL (Buona Pratica di Laboratorio) o a norme equivalenti. Gli utenti e il laboratorio devono avere un sistema di formulazione della diagnosi conforme alle Buone Pratiche di Laboratorio. Tutti i controlli devono risultare compresi entro gli intervalli accettabili indicati sulle etichette e il Certificato QC. Se i criteri non sono soddisfatti il test non è valido e dovrebbe essere ripetuto. Ogni laboratorio dovrebbe usare campioni noti come ulteriori controlli. Si consiglia la partecipazione a programmi di controllo qualità periodici.

In caso di deviazioni devono essere forniti i seguenti dati: Scadenza dei reagenti (preparati), condizioni di conservazione, pipette, strumenti, condizioni d'incubazione e metodi di lavaggio.

## 13 CALCOLO DEI RISULTATI

La DO ottenute per gli standard (asse y, lineare) sono messe in grafico rispetto alla loro concentrazione (asse x, logaritmico) sia su carta per grafico semilogaritmico che con metodo automatico. Buoni risultati si ottengono con grafici cubic spline, 4 Parametri Logistica o Logit-Log.

Per il calcolo della curva standard utilizzare ogni segnale degli standard (omettere ovviamente i valori dei duplicati molto al di fuori dei risultati attesi e impiegare il valore singolo più plausibile).

La concentrazione dei campioni può essere ricavata dalla curva standard.

A causa della diluizione dei campioni di urina i valori dell'urina devono essere moltiplicati per un fattore 101.

I campioni con concentrazioni superiori al più alto degli standards devono essere diluiti come descritto nel paragrafo ISTRUZIONI PRE-TEST e ritestati.

### Conversione:

Sulla base del peso molecolare della Neopterin (MW: 253.2 g/mol) e della Creatinina (MW: 113.1 g/mol) si può fare un calcolo delle varie unità come segue:

### Siero/Plasma:

Neopterin	$(\text{nmol/L}) \times 0.253 = (\text{ng/mL})$
	$(\text{ng/mL}) / 0.253 = (\text{nmol/L})$

### Urina:

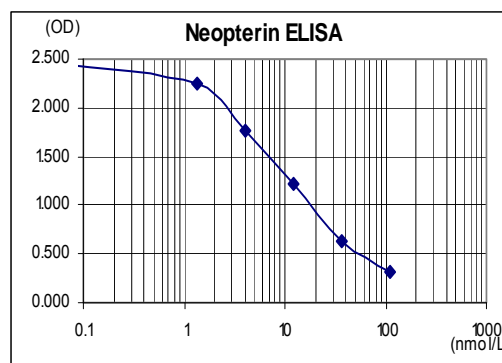
Normalmente, la neopterin nell'urina è correlata alla creatinina (che dev'essere analizzata con un metodo separato) ed espressa nel rapporto neopterin/creatinina (UNCR) in  $\mu\text{mol}$  neopterin/mol creatinina:

Creatinina	$(\text{mg/dL}) \times 88.4 = (\mu\text{mol/L})$
	$(\mu\text{mol/L}) / 1000 = (\text{mmol/L})$
	$(\text{mmol/L}) / 1000 = (\text{mol/L})$
Neopterin	$(\text{nmol/L}) / 1000 = (\mu\text{mol/L})$

## Tipica Curva di Calibrazione

(Esempio. Non usare per il calcolo!)

Standard	Neopterin (nmol/L)	DO <sub>Media</sub>	DO/DO <sub>max</sub>
A	0.00	2.449	100
B	1.35	2.238	91
C	4.00	1.772	72
D	12.0	1.209	49
E	37.0	0.634	26
F	111	0.325	13



**14 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Neopterin (Siero)	Interpretazione
< 10 nmol/L	normale
> 10 nmol/L	alto

I soli risultati non dovrebbero essere l'unica motivazione alla base di una scelta terapeutica. Devono essere correlati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

**15 VALORI ATTESI**

Soggetti apparentemente sani mostrano i seguenti valori:

Siero		Siero/Plasma			(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)	
nmol/L	ng/mL	Età	Sesso	Neopterin nmol/L		
< 10	< 2.5			Media		limite superiore
		0-18	♂, ♀	6.78		13.5
		19-75	♂, ♀	5.34	8.7	
		> 75	♂, ♀	9.67	19.0	

Urina				(Neopterin Biochemistry – Methods - Clinical Application; H. Wachter et al. (1992), Walter de Gruyter, Berlin - New York)
Età	Sesso	µmol Neopterin/mol Creatinina		
		Media	limite superiore	
1-4	♂, ♀	267	432	
4-7	♂, ♀	226	405	
7-12	♂, ♀	181	374	
12-15	♂, ♀	171	343	
15-18	♂, ♀	144	320	
	♂	123	195	
18-25	♀	128	208	
	♂	101	182	
26-35	♀	124	209	
	♂	109	176	
36-45	♀	140	239	
	♂	105	197	
46-55	♀	147	229	
	♂	119	218	
56-65	♀	156	249	
	♂	133	229	
>65	♀	151	251	

Si consiglia ad ogni laboratorio di calcolare i propri valori di riferimento.

**16 LIMITI DELLA PROCEDURA**

La raccolta e conservazione dei campioni ha influenza significativa sui risultati del test. Vedere la sezione PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI per maggiori dettagli.

Per le reazioni crociate vedere la sezione PERFORMANCE.

I seguenti componenti del sangue non influenzano significativamente ( $\pm 20\%$  del valore atteso) i risultati del test fino alle concentrazioni indicate di seguito:

Emoglobina	5.0 mg/mL
Bilirubina	2.5 mg/mL
Trigliceridi	45.5 mg/mL

**Non utilizzare campioni che contengono sodio azide** poichè questi campioni portano a risultati erroneamente alti.

I campioni di pazienti che dopo un trapianto sono stati trattati con ATG (globulina anti-linfocita T di coniglio) daranno risultati erroneamente alti. Questo effetto può essere evitato pre-incubando i campioni come descritto nelle ISTRUZIONI PRE-TEST.

**17 PERFORMANCE**

<b>Specificità Analitica (Reazione crociata)</b>	Sostanza	Reattività Crociate (%)		Cross-reattività di altre sostanze esaminate < 0.05 %
	7,8-Diidro-Neopterin	2.0		
	5,6,7,8-Tetraidro-Neopterin	< 0.44		
	D-Monapterin	< 0.17		
	L-Monapterin	< 0.03		
	L-Biopterina	< 0.01		
	7,8-Diidro-L-Biopterina	< 0.03		
<b>Sensibilità Analitica (Limite di Rilevazione)</b>	0.7 nmol/L	Media (Zero-Standard) - 2SD		
<b>Precisione</b>		Intervallo (nmol/L)	CV (%)	
Intra-Saggio	Siero	3.1 - 43	4.3 - 11.7	
	Urina	932 - 5112	5.3 - 11.2	
Inter-Saggio	Siero	4.67 - 29.98	8.8 - 13.8	
	Urina	2616 - 4419	9.3 - 14.4	
<b>Linearità</b>		Intervallo (nmol/L)	Intervallo (%)	Diluizioni Seriali fino a
	Siero	1.8 - 51.5	91 - 114	1:16
	Urina	234 - 3622	87 - 120	1:8
<b>Recupero</b>		Media (%)	Intervallo (%)	% Recupero dopo i picchi
	Siero	99	81 - 116	
	Urina	94	84 - 117	
<b>Metodo di Paragone verso HPLC</b>	Siero	Test DRG = 1.18 x HPLC + 0.44		r = 0.92; n = 111
	Urina	Test DRG = 1.17 x HPLC - 13.52		r = 0.99; n = 27

**18 REFERENCES/LITERATURE / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

1. Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Weiss G, Werner ER, Werner-Felmayer G. Neopterin: Biochemistry - Methods - Clinical Application. Walter de Gruyter Berlin, New York, (1992)
2. Westermann J, Thiemann F, Gerstner L, Tatzber F, Kozák I, Bertsch T, Krüger C. Evaluation of a New Simple and Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Neopterin Determination. *Clin Chem Lab Med*, 38 (4): 345-353 (2000)
3. X Garcia-Moll, D Cole, E Zouridakis, JC Kaski. Increased serum Neopterin: a marker of coronary artery disease activity in woman. *Heart* 83:346-350 (2000)
4. Smith D, Zouridakis, E, Mariani M, Fredericks S, Cole D, Kaski J. Neopterin levels in patients with coronary artery disease are independent of Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Am Heart J*, 146 (1): 69-74 (2003)
5. B. Inci Fisenk, Durdal US, Osman I. Ozcebe & Gulsen Hascelik. The value of increased Neopterin levels in reducing transfusion-transmitted virus infections: Detection of a donation from a HbsAg positive chronic carrier by screening of neopterin in Turkish blood donors. *Scandinavian Journal of Infectious disease*, 37:599-604 (2005)
6. Michaela Bayer, Sven Schmitz, Jürgen Westermann, Frank Thiemann, Ralf Edelmann, Claudia Szakacs, Gerhardt Lanzer, Jens Blecken. Evaluation of a New-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Neopterin. *Clin Lab*. 51 (2005)
7. R. Weimer, C. Süsal, S. Yildiz, A. Staak, S. Pelzl, F. Renner, H. Dietrich, V. Daniel, S. Kamali-Ernst, W. Padberg, G. Opelz. Post-Transplant sCD30 and Neopterin as Predictors of Chronic Allograft Nephropathy: Impact of Different Immunosuppressive Regimes. *American Journal of Transplantation* (2006)
8. Cangel P.Y. Chan, Junet W.Y. Choi , Kai-Yuan Cao, Ming Wang, Yang Gao, Duan-Hua Zhou, Biao Di, Hui-Fang Xu, Man-Fai Leung, Andreas Bergmann, Matthias Lehmann, Yong-Mei Nie, George W.H. Cautherley, Dietmar Fuchs, Reinhard Renneberg, Bo-Jian Zheng. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. *Journal of Infection* (2006)
9. Douglas T. Johnston, Marios Gagos, Nicolas Raio, Louis Ragolia, David Shenouda, Mark A. Davis-Lorton, Joshua R. De Leon. Alterations in serum neopterin correlate with thrombolysis in myocardial infarction risk scores in acute coronary syndromes. *Coronary artery disease* 2006, 17:511-516
10. SP Gieseg, EM Crone, EA Flavall, Z Amit. Potential to inhibit growth of atherosclerotic plaque development through modulation of macrophages neopterin/ 7,8-dihydroneopterin synthesis. *British Journal of Pharmacology* (2007)
11. Kausik K. Ray, David A. Morrow, Marc S. Sabatine, Amy Shui, Nader Rifai, Christopher P. Cannon, Eugene Braunwald. *Circulation* 2007; 115; 3071:3078



## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité