

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung****IL-1 $\beta$ -ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

## 1. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in serum and plasma.

## 2. CLINICAL BACKGROUND

### 2.1 Biological activities

Human interleukin-1 (IL-1) is a key mediator of the host response to various infectious, inflammatory and immunologic challenges. Two distinct polypeptides, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , mediate IL-1 biological activities and bind to the same cell surface receptor. Both are initially synthesized as 31-kDa intracellular precursors that are subsequently found as mature proteins of 17 kDa in monocyte supernates. Membrane-bound IL-1 has also been described and may account for a part of IL-1 mediated local effects. The primary sources of IL-1 are blood monocytes and tissue macrophages. Other specialized cells such as T- and B-lymphocytes, various epithelial, endothelial and some mesenchymal cells can also produce IL-1. IL-1 $\beta$  is the major form secreted by monocytes and macrophages which are believed to be the main source of circulating (plasma) IL-1. Inhibitions of IL-1 activity have been described in plasma and other biological fluids. IL-1 affects several unrelated tissues and is a main mediator of the "acute phase" inflammatory responses characterised by alterations in metabolic, endocrinologic and immunologic functions. This cytokine has an essential role in T-cell activation, providing one of the necessary signals for IL-2 (T-cell growth factor) production. It is the main mediator of inflammatory processes by acting on the nervous system (fever, sleep, anorexia), on bone marrow-derived cells (chemotaxis and/or activation of neutrophils, monocytes and lymphocytes) and on various tissues (fibroblast proliferation, resorption of cartilage and bone matrices, glial cell proliferation, stimulation of endothelial cell procoagulant activity, etc.). Most of these activities are directly attributable to IL-1 $\beta$ , but others are mediated in collaboration with other cytokines such as IL-6, interferons, and tumor necrosis factor. IL-1 stimulates the production or acts synergistically with these cytokines and the final biological activity is thus the result of a network of interactions between these various mediators.

### 2.2 Clinical application

The biological properties of IL-1 $\beta$  and its key role in inflammatory processes suggest its involvement in the pathogenesis of many diseases. Indeed, high amounts of IL-1 are found in the joint effusions of some patients with rheumatoid and non-rheumatoid inflammatory joint diseases, in infectious pleural or peritoneal fluids, and in the drainage fluid of patients undergoing chronic diabetes, periodontal diseases, etc. Although little or no IL-1 $\beta$  is normally detected in human plasma or serum obtained from healthy, rested human subjects, elevated levels have been reported in the circulation of febrile or septic patients, in patients with Crohn's disease, during graft rejection, in healthy volunteers after extended exercise and in women following ovulation. Studies based on in vitro production of IL-1 by isolated blood leukocytes have demonstrated reduced IL-1 production in malnourished patients and cancer patients with large tumor burdens. Hence, this immunoassay for IL-1 $\beta$  is an important tool to study macrophage activation and to investigate the role of IL-1 $\beta$  in various (physiological or pathological) immune and inflammatory processes.

## 3. PRINCIPLES OF THE METHOD

The IL-1 $\beta$ -ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-1 $\beta$ . Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – human IL-1 $\beta$  – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the IL-1 $\beta$  concentration.

A calibration curve is plotted and IL-1 $\beta$  concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the ELISA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

## 4. REAGENTS PROVIDED

**IL E-3031**

 **96**

**Microtiterplate – Ready for use**

Content:

Microtiterplate with 96 anti IL-1 $\beta$  (monoclonal antibodies) coated wells

**IL E-3040****CONJUGATE****Conjugate – Ready for use**

Content: Conjugate: HRP labelled anti-IL-1 $\beta$  (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleatel buffer with bovine serum albumin and thymol

Volume: 1 x 6 ml

Hazard identification:



H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

**Calibrators and Controls – lyophilized**

Cat. no.	Component	Calibrator/Control	
<b>IL E-3001</b>	<b>CAL 0</b>	Calibrator 0	1 vial
<b>IL E-3002</b>	<b>CAL 1</b>	Calibrator 1	1 vial
<b>IL E-3003</b>	<b>CAL 2</b>	Calibrator 2	1 vial
<b>IL E-3004</b>	<b>CAL 3</b>	Calibrator 3	1 vial
<b>IL E-3005</b>	<b>CAL 4</b>	Calibrator 4	1 vial
<b>IL E-3006</b>	<b>CAL 5</b>	Calibrator 5	1 vial
<b>IL E-3051</b>	<b>CONTROL 1</b>	Control 1	1 vial
<b>IL E-3052</b>	<b>CONTROL 2</b>	Control 2	1 vial

Content: Calibrators (see exact values on vial label) / Controls in human serum, benzamidine and thymol

Preparation: **Add** 2 ml distilled water.

**IL E-3060****DILUENT****Specimen Diluent – lyophilized**

Content: Specimen Diluent: human serum, benzamidine and thymol

Volume: 3 vials

Preparation: **Add** distilled water (see on the label for the exact volume).

**IL E-3030****WASH-CONC 200x****Wash Solution – 200x concentrated**

Content: Wash Solution (TRIS-HCl)

Volume: 1 x 10 ml

Preparation: **Dilute** 200x with distilled water (use a magnetic stirrer).

Hazard identification:



H317 May cause an allergic skin reaction.

**IL E-3055****SUBSTRATE****Chromogen TMB – Ready for use**

Content: Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)

Volume: 1 x 25 ml

**IL E-3080****STOP-SOLN****Stopping Solution – Ready for use**

Content: Stopping Solution: 1.0 N HCl

Volume: 1 x 12 ml

Hazard identification:



H290 May be corrosive to metals.

**Note:**

1. Use the *Specimen Diluent* for sample dilution.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 100 mIU of the NIBSC 1<sup>st</sup> IS 86/680.

**5. SUPPLIES NOT PROVIDED**

The following material is required but not provided in the kit:

1. High quality distilled water

2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 200 µl, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm  $\pm$  100 rpm
6. Washer for Microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

## 6. REAGENT PREPARATION

### **Calibrators:**

Reconstitute the Calibrators with 2 ml distilled water.

### **Controls:**

Reconstitute the Controls with 2 ml distilled water.

### **Specimen Diluent:**

Reconstitute *Specimen Diluent* to the volume specified on the vial label with distilled water.

### **Working Wash solution:**

Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

## 7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 °C to 8 °C.
- Unused strips must be stored, at 2 – 8 °C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators, controls and specimen diluent are stable for 4 days at 2 °C to 8 °C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20 °C for maximum 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at 18 – 25 °C until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 °C to 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be removed as soon as possible from the clot of red cells after clotting and centrifugation, and kept at 4 °C. If the samples are not used immediately, they must be kept at -20 °C for maximum 2 months, and at -70 °C for longer storage (maximum one year).
- Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at 18 – 25 °C. It is recommended to vortex the samples before use.
- Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate IL-1 $\beta$  production by blood cells and thus falsely increase plasma IL-1 $\beta$  values.
- Collection tubes must be pyrogen-free. Plasma can be collected on sterile EDTA and rapidly separated after centrifugation. The use of heparin tubes is discouraged as batches of heparin are often contaminated with pyrogen.

## 9. PROCEDURE

### 9.1 Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to 18 – 25 °C prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section 12.5 (Time delay).
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

- The Chromogenic Solution should be colourless. If a blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable, and must be discarded.
- Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
- During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

## 9.2 Procedure

<b>1.</b>	Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2 – 8 °C.
<b>2.</b>	Secure the strips into the holding frame.
<b>3.</b>	Pipette 200 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
<b>4.</b>	Pipette 50 µl of anti-IL-1β-HRP conjugate into all the wells.
<b>5.</b>	Incubate for 2 hours at 18 – 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
<b>6.</b>	Aspirate the liquid from each well.
<b>7.</b>	Wash the plate 3 times by: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well</li> <li>– Aspirating the content of each well</li> </ul>
<b>8.</b>	Pipette 200 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
<b>9.</b>	Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18 – 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
<b>10.</b>	Pipette 100 µl of Stop solution into each well.
<b>11.</b>	Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 3 hours and calculate the results as described in section 10.

## 10. CALCULATION OF RESULTS

### 10.1 Polychromatic Reading

1. In this case, the software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
  - $X_i$  = OD at 450 nm
  - $Y_i$  = OD at 490 nm
  - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated:  $Y = A \cdot X + B$
  - If  $X_i < 3$  OD units, then  $X$  calculated =  $X_i$
  - If  $X_i > 3$  OD units, then  $X$  calculated =  $(Y_i - B) / A$
  - A 4-parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
  - The IL-1β concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

### 10.2 Bichromatic Reading

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-1β (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

## 11. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

IL-1β-ELISA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml	0.013
	24 pg/ml	0.121
	89 pg/ml	0.336
	320 pg/ml	1.042
	574 pg/ml	1.693
	1166 pg/ml	2.704

## 12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### 12.1 Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.35 pg/ml.

### 12.2 Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 500 ng/ml of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES. This IL-1 $\beta$  assay is specific for human natural and recombinant IL-1 $\beta$ .

### 12.3 Precision

Intra Assay				Inter Assay			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	127 $\pm$ 3	2.3	A	20	120 $\pm$ 6	4.9
B	10	733 $\pm$ 11	1.4	B	20	549 $\pm$ 14	2.5

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

### 12.4 Accuracy

Recovery Test

Sample	Added IL-1 $\beta$ (pg/ml)	Recovered IL-1 $\beta$ (pg/ml)	Recovery (%)
Serum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

Dilution Test

Sample	Dilution	Theoretical Conc. (pg/ml)	Measured Conc. (pg/ml)
Serum	1/1	–	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	–	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Samples were diluted with *Specimen Diluent*.

## 12.5 Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

Time Delay

	t0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

## 12.6 Hook effect

A sample spiked with IL-1 $\beta$  up to 1  $\mu$ g/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

## 13. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

## 14. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

For guidance, the mean of 22 normal serum samples was 5.4 pg/ml (SD = 3.9), ranging between 0 pg/ml and 13.6 pg/ml. This study was performed on samples from apparently healthy persons with low CRP levels.

For guidance, the mean of 103 normal plasma was 2.6 pg/ml (SD = 5.3), ranging between 0 pg/ml and 17 pg/ml (based on 2.5% to 97.5% percentiles). This study was performed with samples collected in strict sampling condition.

## 15. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## 16. BIBLIOGRAPHY

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982).  
**Interleukin-1 is more than an interleukin.**  
Immunology Today, 3:113-119.
2. MIZEL S.B., (1982).  
**Interleukin-1 and T-cell activation.**  
Immunol. Rev., 63:51-71.
3. DINARELLO C.A., (1984).  
**Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.**  
N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
4. DINARELLO C.A., (1985).  
**An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance.**  
J. Clin. Immunol., 5:287-297.
5. BAILLY, S. et al., (1994)  
**Comparative production of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  by LPS-stimulated human monocytes: ELISAs measurement revisited.**  
Cytokine, 6:111-115.
6. DINARELLO C.A., (1988)  
**Biology of interleukin-1.**  
FASEB J., 2:108-115.

## 17. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Calibrators ( $\mu$ l)	Sample(s) / Controls ( $\mu$ l)
Calibrators (0 – 5)	200	–
Samples, Controls	–	200
Anti-IL-1 $\beta$ -HRP Conjugate	50	50
Incubate for 2 hours at 18 – 25 °C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	200	200
Incubate for 15 min at 18 – 25 °C with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm).		

### Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				



## 1. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrischer Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in Serum und Plasma.

## 2. KLINISCHER HINTERGRUND

### 2.1 Biologische Aktivität

Humanes Interleukin-1 (IL-1) ist der Schlüsselm mediator für die Entzündungsantwort auf unterschiedliche infektiöse, entzündliche oder immunologische Abläufe. Zwei verschiedene Polypeptide, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sind als Mediatoren verantwortlich für die biologischen Aktivitäten von IL-1 und binden am selben Oberflächenrezeptor der Zelle. Beide sind ursprünglich synthetisiert als 31-kDA intrazelluläre Zwischenprodukte, die anschließend als reife Proteine von 17 kDA im Monozytenüberstand gefunden werden. Membrangebundenes IL-1 wurde auch so beschrieben und ist möglicherweise für einen Teil der durch IL-1 vermittelten lokalen Effekte verantwortlich. Die ursprünglichen Quellen des IL-1 sind Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen. Andere spezialisierte Zellen wie T- und B-Lymphozyten, unterschiedliche epitheliale, endotheliale und einige mesenchymale Zellen können ebenfalls IL-1 produzieren. IL-1 $\beta$  ist die Hauptform, sekretiert von Monozyten und Makrophagen, welche als Hauptquelle des zirkulierenden (Plasma) IL-1 angesehen werden. Unterdrückungen der Aktivität von IL-1 wurden bei Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten beschrieben. IL-1 beeinflusst verschiedene unverbundene Gewebe und ist ein Hauptvermittler der "akuten Phase" der inflammatorischen Antwort des Organismus, die charakterisiert wird durch die Veränderung der metabolischen, endokrinologischen und immunologischen Funktionen. Dieses Zytokin spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen, indem es eines der notwendigen Signale für die Produktion von IL-2 (T-Zell-Wachstumsfaktor) induziert. Es ist der Hauptmediator entzündlicher Prozesse, indem es auf das Nervensystem (Fieber, Schlaf, Appetitlosigkeit), auf die Knochenmarkszellen (Chemotaxis, und/oder Aktivierung der Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten) und auf verschiedene Gewebe (Proliferation des Fibroblasts, Resorption von Knorpel und Knochenkitsubstanz, Proliferation der Gliazelle, Stimulation der Prokoagulanaktivität der endothelialen Zelle etc.) einwirkt. Die meisten dieser Aktivitäten werden direkt IL-1 $\beta$  zugeschrieben, aber andere werden in Zusammenarbeit mit anderen Zytokinen wie IL-6, Interferonen und dem Tumor-Nekrose-Faktor vermittelt. IL-1 stimuliert die Produktion oder wirkt synergistisch mit diesen Zytokinen, wonach die letztendliche biologische Aktivität das Resultat des Netzwerks der Interaktionen zwischen den verschiedenen Mediatoren ist.

### 2.2 Klinische Anwendung


Die biologischen Eigenschaften des IL-1 und seine Schlüsselrolle bei entzündlichen Prozessen legt seine Involvierung bei der Pathogenese vieler Krankheiten nahe. In der Tat wurden hohe Werte von IL-1 in Gelenkergüssen einiger Patienten mit rheumatischen oder nicht-rheumatischen, entzündlichen Gelenkserkrankungen, bei Infektionen pleuraler oder peritonealer Flüssigkeiten, in der Drainageflüssigkeit von Patienten, die an chronischer Diabetes leiden, bei parodontalen Erkrankungen etc. gefunden. Obgleich wenig oder kein IL-1 $\beta$  in humanem Plasma oder Serum, das von gesunden, ausgeruhten menschlichen Subjekten entnommen wurde, gefunden wird, wird von erhöhten Werten im Kreislauf von fieberigen oder septischen Patienten, Patienten mit Crohn-Krankheit, während Transplantatabstoßung, bei gesunden Freiwilligen nach schwerer körperlicher Anstrengung und bei Frauen nach dem Eisprung berichtet. Studien, die auf der in vitro Produktion von IL-1 mittels isolierter Blutleukozyten basieren, haben eine reduzierte Produktion von IL-1 bei schlecht ernährten Patienten und solchen, die unter großen Krebstumoren leiden, gezeigt. Daher ist dieser Immunoassay für IL-1 $\beta$  ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung der Makrophagenaktivierung und zur Erforschung der Rolle des IL-1 $\beta$  bei verschiedenen (physiologischen oder pathologischen) Immun- und Entzündungsprozessen.

## 3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der IL-1 $\beta$ -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von IL-1 $\beta$  gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAK 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind und mit einem monoklonalen Antikörper (MAK 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAK 1 – IL-1 $\beta$  – MAK 2 – MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-1 $\beta$ -Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IL-1 $\beta$ -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des ELISA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

#### 4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

**IL E-3031**  **96** **Microtiterplate** – gebrauchsfertig  
 Inhalt: Mikrotiterplatte mit 96 anti IL-1 $\beta$ - beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)

**IL E-3040** **CONJUGATE** **Conjugate** – gebrauchsfertig  
 Inhalt: Konjugat: MRP beschriftete Anti-IL-1 $\beta$  (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol

Volumen: 1 x 6 ml

Mögliche  
Gefahren:



H315 Verursacht Hautreizungen.  
 H319 Verursacht schwere Augenreizung.

#### Kalibratoren und Kontrollen – lyophilisiert

Artikelnr.	Komponente	Kalibrator/ Kontrolle	
<b>IL E-3001</b>	<b>CAL 0</b>	Kalibrator 0	1 Fläschchen
<b>IL E-3002</b>	<b>CAL 1</b>	Kalibrator 1	1 Fläschchen
<b>IL E-3003</b>	<b>CAL 2</b>	Kalibrator 2	1 Fläschchen
<b>IL E-3004</b>	<b>CAL 3</b>	Kalibrator 3	1 Fläschchen
<b>IL E-3005</b>	<b>CAL 4</b>	Kalibrator 4	1 Fläschchen
<b>IL E-3006</b>	<b>CAL 5</b>	Kalibrator 5	1 Fläschchen
<b>IL E-3051</b>	<b>CONTROL 1</b>	Kontrolle 1	1 Fläschchen
<b>IL E-3052</b>	<b>CONTROL 2</b>	Kontrolle 2	1 Fläschchen

Inhalt: Kalibratoren (genaue Werte auf den Flaschenetiketten) / Kontrollen in Humanserum mit Benzamidin und Thymol

Vorbereitung: 2 ml dest. Wasser **zugeben**.

**IL E-3060** **DILUENT** **Specimen Diluent** – lyophilisiert

Inhalt: Probenverdünner: Humanserum mit Benzamidin und Thymol

Volumen: 3 Flaschen

Vorbereitung: **Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen).**

**IL E-3030** **WASH-CONC 200x** **Wash Solution** – 200x konzentriert

Inhalt: Waschlösung (TRIS-HCl)

Volumen: 1 x 10 ml

Vorbereitung: 200 x mit dest. Wasser **verdünnen** (Magnetrührer benutzen).

Mögliche  
Gefahren:



H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

**IL E-3055** **SUBSTRATE** **Chromogen TMB** – gebrauchsfertig

Inhalt: Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)

Volumen: 1 x 25 ml

**IL E-3080** **STOP-SOLN** **Stopping Solution** – gebrauchsfertig

Inhalt: Stopplösung: 1,0 N HCl

Volumen: 1 x 12 ml

Mögliche  
Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

#### Bemerkung:

- Benutzen Sie den Probenverdünner zur Probenverdünnung.
- 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 100 mIU des NIBSC 1st IS 86/680.

## 5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetrührer
5. Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm  $\pm$  100 rpm
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten  
Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (monochromatische Auswertung)

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

### **Calibrators (Kalibratoren):**

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 2 ml dest. Wasser.

### **Controls (Kontrollen):**

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. Wasser.

### **Specimen Diluent (Probenverdünner):**

Rekonstituieren Sie den Probenverdünner genau bis zu dem auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit dest. Wasser.

### **Working Wash solution (Waschlösung):**

Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

## 7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren, Probenverdünner und Kontrollen bei 2 °C bis 8 °C 4 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren werden, dann sind sie 2 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei 18 – 25 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2 °C bis 8 °C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

## 8. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Das Serum muss so schnell wie möglich vom Blutgerinnsel der roten Zellen nach Gerinnung und Zentrifugation getrennt und bei 4 °C aufbewahrt werden. Werden die Proben nicht direkt benutzt, müssen sie bei -20 °C für maximal 2 Monate gelagert werden. Eine längere Lagerdauer (maximal 1 Jahr) erfordert eine Lagerung bei -70 °C.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben 18 – 25 °C erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Die Bedingungen der Probennahme können Werte beeinflussen, weshalb strenge Vorsichtsmaßnahmen während des Sammelns ergriffen werden müssen, um Unreinheiten im gesammelten Material, die die IL-1 $\beta$  Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Plasma IL-1 $\beta$  Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten. Plasma kann mit sterilen EDTA gesammelt und nach der Zentrifugation schnell getrennt werden. Vom Gebrauch von Heparin-Röhrchen wird abgeraten, da Heparin-Chargen des Öfteren mit Pyrogen kontaminiert sind.

## 9. DURCHFÜHRUNG

### 9.1 Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf 18 – 25 °C.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

- Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt 12.5 (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie die Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

## 9.2 Durchführung

<b>1.</b>	Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
<b>2.</b>	Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
<b>3.</b>	Pipettieren Sie jeweils 200 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
<b>4.</b>	Pipettieren Sie 50 µl Anti-IL-1β-MRP-Konjugat in alle Wells.
<b>5.</b>	Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 – 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
<b>6.</b>	Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
<b>7.</b>	Waschen Sie die Platte dreimal: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well</li> <li>– Saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab</li> </ul>
<b>8.</b>	Pipettieren Sie 200 µl der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
<b>9.</b>	Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 – 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
<b>10.</b>	Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
<b>11.</b>	Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 3 Stunden aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt 10 beschrieben.

## 10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### 10.1 Polychromatische Auswertung

1. In diesem Fall werden die Daten durch die Software verarbeitet.
2. Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
3. Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
4. Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODS bis 10 erstellen.
5. Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
  - $X_i$  = OD bei 450 nm
  - $Y_i$  = OD bei 490 nm
  - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet:  $Y = A \cdot X + B$
  - Wenn  $X_i < 3$  OD-Einheiten, dann  $X$  berechnet =  $X_i$
  - Wenn  $X_i > 3$  OD-Einheiten, dann  $X$  berechnet =  $(Y_i - B) / A$
  - Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
  - Die IL-1β-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

### 10.2 Bichromatische Auswertung

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration IL-1β (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

## 11. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

IL-1 $\beta$ -ELISA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 pg/ml	0,013
	24 pg/ml	0,121
	89 pg/ml	0,336
	320 pg/ml	1,042
	574 pg/ml	1,693
	1166 pg/ml	2,704

## 12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### 12.1 Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,35 pg/ml.

### 12.2 Spezifität

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion beobachtet beim Vorhandensein von 50 ng von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF und RANTES. Dieses IL-1 $\beta$  Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes IL-1 $\beta$ .

### 12.3 Präzision

Intra Assay				Inter Assay			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	127 $\pm$ 3	2,3	A	20	120 $\pm$ 6	4,9
B	10	733 $\pm$ 11	1,4	B	20	549 $\pm$ 14	2,5

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### 12.4 Genauigkeit

Wiederfindungstest

Probe	Zugabe IL-1 $\beta$ (pg/ml)	Wiedergef. IL-1 $\beta$ (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

## Verdünnungstest

Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (pg/ml)	Gemessene Konz. (pg/ml)
Serum	1/1	–	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	–	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Die Proben wurden mit Probenverdünner verdünnt.

### 12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

Zeitdifferenz

	t0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

### 12.6 Hook-Effekt

Eine Probe mit IL-1 $\beta$  bis zu 1  $\mu$ g/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

## 13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

## 14. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Zur Orientierung: Der Mittelwert von 22 normalen Serumproben lag bei 5,4 pg/ml (SD = 3,9), Werte zwischen 0 pg/ml und 13,6 pg/ml. Diese Studie wurde durchgeführt mit Proben von anscheinend gesunden Personen mit niedrigen CRP Werten.

Der Mittelwert von 103 normalen Plasmaproben, gesammelt unter strengen Sammelbedingungen lag bei 2,6 pg/ml (SD = 5,3), Werte zwischen 0 pg/ml und 17 pg/ml (auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile).

## 15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden. Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

## 16. LITERATUR

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982).

### **Interleukin-1 is more than an interleukin.**

Immunology Today, 3:113-119.

2. MIZEL S.B., (1982).

### **Interleukin-1 and T-cell activation.**

Immunol. Rev., 63:51-71.

3. DINARELLO C.A., (1984).

### **Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.**

N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.

4. DINARELLO C.A., (1985).

### **An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance.**

J. Clin. Immunol., 5:287-297.

5. BAILLY, S. et al., (1994)

### **Comparative production of IL-1 $\beta$ and IL-1 $\alpha$ by LPS-stimulated human monocytes: ELISAs measurement revisited.**

Cytokine, 6:111-115.

6. DINARELLO C.A., (1988)

### **Biology of interleukin-1.**














FASEB J., 2:108-115.

## 17. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	Kalibratoren ( $\mu$ l)	Probe(n) / Kontrollen ( $\mu$ l)
Kalibratoren (0 – 5)	200	–
Proben, Kontrollen	–	200
Anti-IL-1 $\beta$ -MRP Konjugat	50	50
2 Stunden bei 18 – 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 $\mu$ l Waschlösung waschen und absaugen.		
Substratlösung	200	200
15 min. bei 18 – 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) und 490 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.		

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**Symbole:**

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				