

ANTI-SKIN ANTIBODY TEST SYSTEM

For *In Vitro* Diagnostic Use

AD SMO48 48 Tests
AD SMO96 96 Tests

Introduction:

The *in vitro* detection of skin antibodies by the indirect immunofluorescent technique has been established as an aid in the diagnosis of skin and systemic diseases. The utilization of monkey esophagus, has been the recommended substrate for IFA. Monkey esophagus is used for the detection of both basement membrane antibodies and intercellular substance antibodies.^{1,5} The intercellular substance antibody has been associated with the presence of a variety of disorders of the skin.³ The detection of the basement membrane antibody has been associated with the presence of a variety of bullous pemphigoid autoimmune disorders of the skin.³

Principles:

The primary test reaction involves circulating anti-epidermal antibodies present in the patient's serum, which attach to their homologous epidermal antigens. This occurs during the incubation period while the serum covers the antigen surface. A secondary reaction then follows a rinsing period which removes all unbound human antibody. The reagent used in the secondary reaction is a fluorescein labeled anti-human globulin conjugate containing Evans Blue Counterstain. The antigen surface is then thoroughly rinsed free of unbound conjugate and viewed under the appropriate fluorescent microscope for various morphological patterns of epidermal fluorescence which can be visually identified.

Materials Provided:

Storage & Stability of Components:

- FITC IgG Conjugate No. AD CGEM2 (3.0 ml) (for use with Primate Substrates) is to be stored at 2-8 C upon receipt. The conjugate is stable at this temperature until expiration date on the vial label.
 - The antigen slides of monkey esophagus sections must be stored at 2-8 C upon receipt. Check label for specific expiration date.
 - ASA positive control No. AD PCBM (1.0 ml) for Basement Membrane reaction should be stored at 2-8 C upon receipt. Check label for specific expiration date.
 - ASA positive control No. AD PCIC (1.0 ml) for Intercellular Substance reaction should be stored at 2-8 C upon receipt. Check label for specific expiration date.
 - Universal negative control No. AD NC (1.0 ml) should be stored at 2-8 C upon receipt. Check label for specific expiration date.
 - Buffer Pack No. AD PBS1 - Phosphate Buffered Saline is stable at room temperature storage. Check label for specific expiration date. The reconstituted Buffer does not contain preservatives and should be stored at 2-8 C. Care should be taken to avoid contamination.
 - Mounting Medium No. AD TMM3 is stable when stored at 2-8 C. Check label for specific expiration date.
- Note: All kit components are available separately. Please see the current ALPHADIA Corporation Catalog for more details.

Additional Materials Required but not Provided:

Test tubes and rack or microliter system
Disposable pipettes
Staining Dish and Slide Forceps
Moisture Chamber
Volumetric Flask (500 ml)
Distilled H₂O
Fluorescence Microscope
Paper Towels - lint free

Reagent Preparation:

- Buffer Pack No. AD PBS1. Rehydrate buffer with 1 liter of sterile distilled water.

Specimen Collection:

Serological specimens should be collected under aseptic conditions. Hemolysis is avoided through prompt separation of the serum from the clot. Serum should be stored at 2-8 C if it is to be analyzed within a few days. Serum may be held for 3 to 6 months by storage at -20 C or lower. Lipemic and strongly hemolytic serum should be avoided. When specimens are shipped at ambient temperatures, addition of a preservative such as 0.01% thimerosal or 0.095% sodium azide is strongly recommended.

Test Instruction:

Screening: dilute test serums 1:20 in PBS. **Titration:** set up doubling dilutions of serum starting at 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, etc.

- Once slides reach room temperature tear slide envelope at notch. Carefully remove the slide and avoid touching the antigen areas. The slide is now ready to use.
- Place a drop of diluted serum (20 to 30 µl) and controls over the antigen wells.
- Place slide with patient's serum and controls in a moist chamber for 30 minutes at room temperature (approximately 24 C).
- Remove slide from moisture chamber and allow the serum to run off onto a piece of paper towel. Using a wash bottle, gently rinse remaining sera from slide being careful not to aim the rinse stream directly on to the well.
- Wash in PBS for five minutes. Repeat using fresh PBS.
- Place a blotter on the lab table with absorbent side up. Remove slide from PBS and invert so that tissue side faces absorbent side of blotter. Line up wells to blotter holes. Place slide on top of blotter. **Do not allow tissue to dry.** Wipe back of slide with dry lint free paper towel. Apply sufficient pressure to slide while wiping to absorb buffer.
- Deliver 1 drop (25-30 µl) of conjugate per antigen well. Repeat steps 3-6.
- Place 4-5 drops of mounting medium on slide.
- Apply a 22 x 70 mm coverslip. Examine the slide under a fluorescent microscope. Note: To maintain fluorescence, store mounted slide in a moisture chamber placed in a dark refrigerator.

Quality Control:

- Positive and negative serum controls must be included in each day's testing to confirm reproducibility, sensitivity and specificity of the test procedure.
- The negative serum control should result in little (+) or no fluorescence. If this control shows bright fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
- The positive serum control should result in bright 3+ to 4+ fluorescence. If this control shows little or no fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
- In addition to positive and negative serum controls, a PBS control should be run to establish that the conjugate is free from nonspecific staining of the antigen substrate. If the antigen shows bright fluorescence in the PBS control repeat using fresh conjugate. If the antigen still fluoresces, either the conjugate or antigen may be at fault.

Results:

- Diffuse staining throughout the tissue is considered non-specific and should be considered a negative result.
- Staining of the basement membrane (BM) of the epidermis is considered positive and is associated with 70% of bullous pemphigus cases.
- Staining of the intercellular substance (ICS) of the prickle cell layer of the epidermis is considered positive 90% of pemphigus cases.
- The titer is the highest dilution of the patient's serum, showing a weak 1+ fluorescence of the ICS or BM. Titers of 1:20 or greater are clinically relevant for both patterns.

CORRELATION OF BULLOUS DISEASE TO DIAGNOSTIC ASSAYS

Diseases	Biopsy Findings Direct	Serum Findings Indirect	Relevance of Immunofluorescence Findings
	Immunofluorescence	Immunofluorescence	
Pemphigus, all forms	ICS deposits of IgG	ICS antibodies	DIF and/or IIF diagnostic
Pemphigus, all forms	BM linear IgG and/or C also sometimes other Ig and F	BM antibodies IgG about 70%	DIF or IIF diagnostic
Scarring pemphigoid and Brunsting-Perry variety	BM linear IgG and/or C; also other Ig-90%	BM antibodies IgG about 20%	DIF or IIF diagnostic
Herpes gestations	BM linear, mostly c; also Ig	BM antibodies IgG about 20%	DIF or IIF diagnostic
Herpeticiformis typical	IgA also F and C granular or fibrillar in dermal papillae 85%		DIF diagnostic
Linear IgA dermatosis	IgA linear; 15% at BM; also F & C	No specific antibodies or BM antibodies IgA	DIF diagnostic

KEY TO ABBREVIATIONS:


ICS = Inter-Cellular Substance
BM = Basement Membrane
C = Complement
DIF = Direct Immunofluorescence
IIF = Indirect Immunofluorescence

Limitations of Procedure:

- No diagnosis should be based on a single serologic test since various host factors must be taken into consideration.
- Patients with Lyell's toxic neurolysis, extensive burns and myasthenia gravis may demonstrate intercellular substance staining.
- Additional confirming tests for Bullous diseases are skin biopsy, for direct immunofluorescent analysis and electron microscopy study.

Precautions:

- All human components have been tested by radioimmunoassay for (HB_sA_g) and HTLVIII/LAV by an FDA approved method and found to be negative. (Not repeatedly reactive). However, this does not assure the absence of HB_sA_g or HTLVIII/LAV. All human components should be handled with appropriate care.
- The sodium azide (0.095%) included in the controls and conjugate is toxic if ingested.
- Do not use components beyond their expiration date.
- Follow the procedural instructions exactly as they appear in this insert to insure valid results.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Handle slides by the edges since direct pressure on the antigen wells may damage the antigen.
- Once the procedure has started do not allow the antigen in the wells to dry out. This may result in false negative test results, or unnecessary artifacts.
- Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
- Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination.
- Do not reuse substrate slide.

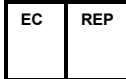
Component	AD PBS1 PBS Powder Packets AD TMM3 Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention: P264 Wash thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves and clothing.
Pictogram		Response: P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing.
Signal Word	WARNING	
Hazard Statement	H319 Causes serious eye irritation	P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.

Bibliography:

1. Beutner et al.: Labeled antibody studies. In: Immunopathology of the Skin. Dowden, Hutchinson and Ross. 1973.
2. Fry and Beah: Immunological Aspects of Skin Diseases. John Wiley and Sons. 1974.
3. Beutner et al.: Autosensitization in Pemphigus and Biliious Pemphigoid. Charles C. Thomas. 1970.
4. Nakamura and Deodhar: Laboratory Tests in the Diagnosis of Autoimmune Disorders. Am Soc Clin Pract, Chicago, Illinois, p. 103-11 1976.
5. Beutner et al.: Immunopathology of the Skin, Second Edition, John Wiley and Sons. 1976.



ALPHADIA sa/nv
DIAGNOSTIC PRODUCTS
Avenue Vésale 26
B1300 WAVRE
BELGIUM
TEL : 32 (0) 10 24 26 49
FAX : 32 (0) 10 24 55 99
contact@alphadia.be



Emergo Europe
Princessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands



ANTI-SKIN ANTIBODY TEST SYSTEM

Per uso *diagnostico in vitro*.

La determinazione *in vitro* di autoanticorpi rivolti verso la cute, mediante immunofluorescenza indiretta ha un ruolo importante nella diagnosi delle malattie autoimmuni della cute e sistemiche. L'esofago di ratto è il substrato raccomandato per l'immunofluorescenza. L'esofago di ratto è utilizzato per la determinazione sia degli autoanticorpi della membrana basale sia degli autoanticorpi della sostanza intercellulare.^{1,5}

La presenza di autoanticorpi contro la sostanza intercellulare è stata associata alla presenza di una varietà di disordini della cute.³

La determinazione degli autoanticorpi rivolti contro la membrana basale è stata associata con la presenza di una varietà di penfigoide bolloso, una malattia autoimmune della cute.³

Principio:

La prima reazione del test coinvolge gli anticorpi antiepidermide circolanti presenti nel siero del paziente i quali si combinano con i loro omologhi antigeni epidermali.

Questo accade durante il periodo d'incubazione quando il siero ricopre la superficie degli antigeni.

Dopo il lavaggio, necessario per la rimozione degli anticorpi umani non legati, si procede con la reazione secondaria. Il reagente utilizzato nella reazione secondaria è un anticorpo antiglobulina umana marcato con fluorescina. La superficie dell'antigene viene quindi completamente risciacquata in modo da eliminare il coniugato non legato e quindi osservata con idoneo microscopio a fluorescenza.

Materiali Forniti:

Conservazione e stabilità dei componenti:

1. FITC IgG Conjugate N°. AD CGEM2 (3.0 ml) (per uso con substrato di primato) deve essere conservato a 2-8 °C una volta aperto. Il coniugato è stabile a questa temperatura fino alla data di scadenza riportata sul flacone.
2. I vetrini con le sezioni d'esofago devono essere conservate a 2-8 °C. Verificare la data di scadenza riportata sulla confezione.
3. ASA controllo positivo per la membrana basale N°. AD PCBM (1.0 ml) deve essere conservato a 2-8 °C. Verificare la data di scadenza riportata sul flacone.
4. ASA controllo positivo per la sostanza intercellulare N°. AD PCIC (1.0 ml) deve essere conservato a 2-8 °C. Verificare la data di scadenza riportata sul flacone.
5. Il controllo negativo universale N°. AD NC (1.0 ml) deve essere conservato a 2-8 °C. Verificare la data di scadenza riportata sul flacone.
6. Buffer Pack N°. AD PBS1 – Il PBS è stabile a temperatura ambiente per 5 anni. Il PBS non contiene conservanti e deve essere conservato a 2-8 °C per evitare la contaminazione.
7. Mounting Medium N°. AD TMM3 è stabile quando conservato a 2-8 °C. Verificare la data di scadenza riportata sul flacone.

Nota: generalmente tutti i componenti del kit sono anche disponibili separatamente. Verificare la loro effettiva disponibilità sul catalogo del distributore locale:

Materiali aggiuntivi richiesti ma non in dotazione:

- Provette di titolazione e rack porta provette.
- Pipette monouso.
- Vaschetta per colorazione e pinzette per vetrini
- Camera umida.
- Matraccio tarato (500 ml)
- Acqua distillata.
- Microscopio a fluorescenza
- Carta assorbente che non lasci residui.

Preparazione dei reagenti:

1. Buffer Pack N°. AD PBS1. Reidratare la polvere con un litro di acqua bi-distillata.

Raccolta dei campioni:

I campioni devono essere raccolti in condizioni asettiche. L'emolisi viene evitata grazie ad una pronta separazione del siero dal coagulo. Il siero deve essere conservato a 2-8°C se è da analizzare entro pochi giorni. Deve essere mantenuto a -20°C se lo si vuole conservare per tre-sei mesi. Sono da scartare sieri lipemici e fortemente emolitici.

Quando i campioni sono trasportati a temperatura ambiente è vivamente consigliata l'aggiunta di un conservante quale 0,01% di Merliotolo oppure 0,95% di azoturo.

Istruzioni del test:

Diluire i sieri da testare 1:20 in PBS per eseguire uno screening. Per le titolazioni approntare diluizioni seriali in PBS a partire dalla diluizione 1:20 (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, ecc.).

1. Mettere una goccia (20-30 µl) dei sieri da testare, opportunamente diluiti e dei controlli su ciascun pozzetto, avendo cura di coprire tutto il sito reattivo.
2. Incubare in camera umida per 30 minuti a temperatura ambiente.
3. Al termine dell'incubazione eliminare delicatamente i sieri dal vetrino. Lavare il vetrino con una spruzzetta contenente PBS, avendo cura di non dirigere il getto direttamente sul pozzetto.
4. Immergere i vetrini in una vaschetta contenente PBS ed effettuare due lavaggi di cinque minuti ciascuno.
5. Porre la maschera di carta bibula sul tavolo di laboratorio con il lato assorbente rivolto verso l'alto. Rimuovere il vetrino dal PBS e posizionarlo capovolto sulla maschera di carta bibula, facendo combaciare i pozzetti con i fori della maschera. NON LASCIARE ASCIUGARE I TESSUTI.
6. Asciugare il retro del vetrino con carta bibula applicando una leggera pressione. NON LASCIARE SECCARE I TESSUTI.
7. Mettere una goccia (25-30 µl) di coniugato per pozzetto. Ripetere le operazioni dal punto 3 al punto 6.
8. Mettere 4-5 gocce di mounting medium sul vetrino.
9. Applicare il vetrino coprioggetti ed esaminare ad un microscopio a fluorescenza.

Nota: per conservare la fluorescenza mantenere il vetrino in camera umida, in frigorifero ed al buio.

Controllo Qualità:

1. I controlli positivi e negativi devono essere inclusi in ogni serie di test giornalieri allo scopo di confermare riproducibilità, sensibilità e specificità del test.
2. I sieri di controllo negativi dovrebbero dare come risultato un basso positivo o

non mostrare fluorescenza. Se questo controllo evidenzia fluorescenza intensa, sussiste un problema con il controllo, l'antigene, il coniugato o nell'esecuzione del test.

3. Il controllo positivo dovrebbe avere una fluorescenza paragonabile al 3+/4+. Se questo controllo mostra fluorescenza bassa sussiste un problema con il controllo, l'antigene, il coniugato o nell'esecuzione del test.
4. Oltre ai sieri di controllo positivo e negativo, si raccomanda di eseguire anche un controllo con solo il PBS, per verificare che il coniugato non causi colorazioni aspecifiche dell'antigene substrato. Se l'antigene substrato presenta forte fluorescenza, ripetere il controllo usando coniugato fresco. Se l'antigene continua ad essere fluorescente, sia il coniugato che l'antigene possono essere difettosi.

Risultati:

1. Una colorazione diffusa su tutto il tessuto è considerata aspecifica e andrebbe valutata come risultato negativo.
2. La colorazione della membrana basale (BM) dell'epidermide è considerata positiva ed è associata al 70% dei casi di pemfigo bolloso.
3. La colorazione delle sostanze intercellulari (ICS) della punta dello strato di cellule dell'epidermide è considerata positiva nel 90% dei casi di pemfigo.
4. Il titolo è la diluizione più alta del siero del paziente che mostra una debole fluorescenza 1+ di ICS o DM.

Titoli di 1:20 sono clinicamente rilevanti per entrambi i campioni.

CORRELAZIONE TRA LA MALATTIA BOLLOSA E IL TEST DIAGNOSTICO

Malattie	Biopsia	Sierodiagnosi	Rilievo dei
	Immunofluorescenza Diretta	Immunofluorescenza Indiretta	risultati di immunofluor.
Pemfigo, tutte le forme	Depositi di ICS di IgG	anticorpi ICS	Diagnostica IFD e/o IFI
Pemfigo, tutte le forme	MB IgG lineare e/o C talvolta anche altre Ig e F	MB Ab IgG circa 70%	Diagnostica IFD e/o IFI
Penfigoide muco-Membranoso - e varietà Brunsting -Perry	MB IgG lineare e/o C talvolta anche Ig-90	MB Ab IgG circa 20%	Diagnostica IFD e/o IFI
Herpes gestazion.	MB Lineari, per lo più c; anche Ig	MB Ab IgG circa 20%	Diagnostica IFD e/o IFI
Dermatite Erpetiforme tipica	IgA anche F e C granulare o fibrillare nel derma papillare 85%		Diagnost. IFD
Malattia ad IgA lineari	IgA lineari; 15% alla MB; anche F e C	Nessun Ab specifico- o Ab IgA alla BM	Diagnost. IFD

ABBREVIAZIONI:


SIC = Sostanza Inter Cellulare
MB = Membrana basale
C = Complemento
IFD = Immunofluoresc. Diretta
IFI = Immunofluoresc. indiretta

Limitazioni della procedura:

1. Nessuna diagnosi deve essere basata su di un singolo test sierologico in quanto devono essere tenuti in considerazione diversi fattori.
2. Sieri di pazienti con necrosi epidermica tossica, erosioni estese e miastenia gravis possono dare colorazione della sostanza intercellulare.
3. Test addizionali di conferma per le malattie bollose sono la biopsia della pelle, l'analisi con immunofluorescenza diretta e l'esame al microscopio elettronico.

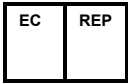
Precauzioni:

1. Tutti i componenti umani sono stati testati con il metodo RIA per (HB_sA_g) e HTLVIII/LAV attraverso un metodo certificato FDA e sono risultati negativi. Ciononostante questo non assicura l'assenza di HB_sA_g o HTLVIII/LAV. Tutti i componenti umani devono essere maneggiati con le opportune attenzioni.
2. L'azoturo di sodio (0,095%) contenuto nei controlli e coniugati è tossico se ingerito.
3. Non usare i componenti dopo la data di scadenza.
4. Seguire in maniera rigorosa le procedure inserite nel foglio d'istruzioni per assicurare risultati validi.
5. Per uso diagnostico *in vitro*.
6. Maneggiare i vetrini per i bordi poiché la pressione diretta sui pozzetti può danneggiare l'antigene.
7. Una volta iniziata la procedura non far seccare l'antigene nei pozzetti. Ciò potrebbe dare risultati falsi negativi.

Componente	AD PBS1 PBS Powder Packets AD TMM3 Mounting Medium	Consiglio di prudenza
Pittogramma		Prevenzione: P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Risposta: P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
AVVERTENZA	ATTENZIONE	
Indicazione di Pericolo	H319 Provoca grave irritazione oculare.	











ALPHADIA sa/nv
DIAGNOSTIC PRODUCTS
Avenue Vesale 26
B1300 WAVRE
BELGIUM
TEL : 32 (0) 10 24 26 49
FAX : 32 (0) 10 24 55 99
contact@alphadia.be



Emergo Europe
Princessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
REF	Catalog number Numero di catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge
EC REP	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter
	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung
	Number of tests Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste
	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsanweisung beachten
	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'Expiration Haltbarkeitsdatum
	Store at 2-8°C / 35-46°F Conservare a 2-8°C/35-46°F Almacenar a 2-8°C / 35-46°F Conserver à 2-8°C Bei 2-8°C / 35-46°F lagern
	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung
	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Biohazard Risque Biologique Potentiel Risque biologique potentiel Gefährdung
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig
IVD	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo in vitro Usage in vitro Für in-vitro diagnostische Verwendung
RUO	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke
IUO	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke
IFA/DFA PBS	Phosphate Buffered Saline Tampone salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate salin PBS
SOR	Sorbent Assorbent Sorbente Absorbant Sorbens

SLIDE	Tissue Substrate Slide Vetrini con substrate di tessuto Porto objetos de Sustrato de Tejido Lame portant le substrat tissulaire Gewebesubstrat-Objekträger
MM	Mounting Medium Mezzo di montaggio Medio de Montaje Liquide de montage Eindeckmedium
10x	Concentration Concentrazione Concentración Concentration Konzentration
ENS	Enhancement solution Soluzione di rinforzo Solución de realce Solution d'amplification Verstärkungslösung
WASHB	Wash Buffer Tampone di lavaggio Tampón de lavado Tampon de lavage Waschpuffer
MPS 12x8	Microplate Strips Strip per Micropiastra Tiras de micro placa Microplaque Mikrotiterplattenstreifen
CONJ	Conjugate Coniugato Conjugado Conjugué Konjugat
SUB	Substrate Substrato Sustrato Substrat Substrat
STOP	Stop Solution Soluzione bloccante Solución de Parada Solution d'arrêt Stopplösung
CAL X	Calibrator(s) Calibratore (i) Calibrador (s) Calibreur(s) Kalibrator(en)
CONTROL -	Negative Control Controllo Negativo Control Negativo Contrôle Négatif Negative Kontrolle
CONTROL +	Positive Control Controllo Positivo Control Positivo Contrôle Positif Positive Kontrolle
CONJ CNS	Counterstain Colorante di contrasto Contraste Contre colorant Gegenfärbung
CS	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläser
CONJ +	Positive Conjugate Conjugato Positivo Conjugado Positivo Conjugué Positif Positivekinjugat
CONJ -	Negative Conjugate Conjugato Negativo Conjugado Negativo Conjugué Négatif Negativekinjugat
DIL	Sample Diluent Diluente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung