

Benzodiazepines Urine

DoA Liquid Test

Benzodiazepines Assay for Urine IVD

Store at 2 - 8°C.

INTENDED USE

The Benzodiazepine Enzyme Immunoassay (EIA) is a homogeneous enzyme immunoassay system intended for use in the qualitative and semi-quantitative analysis of benzodiazepines in human urine.

The assay provides only a preliminary analytical result. A more specific alternative chemical method must be used in order to obtain a confirmed analytical result. Gas Chromatography/mass spectrometry (GC/MS) is the preferred confirmatory method (1, 2). Clinical consideration and professional judgement should be exercised to any result, in order to establish the appropriate treatment or therapy.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The benzodiazepine assay is a homogeneous enzyme immunoassay (3) with ready-to-use liquid reagent. The assay is based on competition between drug in the sample and drug labelled with the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for a fixed amount of antibody in the reagent. Enzyme activity decreases upon binding to the antibody, and the drug concentration in the sample is measured in terms of enzyme activity.

In the absence of drug in the sample, benzodiazepine-labelled G6PDH conjugate is bound to antibody, and the enzyme activity is inhibited. On the other hand, when free drug is present in the sample, antibody would bind to free drug; the unbound benzodiazepine-labelled G6PDH then exhibits its maximal enzyme activity. Active enzyme converts nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) to NADH, resulting in an absorbance change that can be measured spectrophotometrically at 340 nm.

SIGNIFICANCE OF THE TEST

The benzodiazepine family has a diverse chemical structure which gives rise to a range of physio-chemical and pharmacological properties. They form a large group and are used as sedatives and in the treatment of anxiety. It is estimated that over 50 benzodiazepine drugs are in common use world-wide with approximately a dozen marketed within a give country. Benzodiazepines are strongly associated with opioid users (4).

They are usually taken orally (although intravenous and intramuscular routes are also used) and as would be expected from such a diverse group, the pharmacological effects are broad and are also related with the absorption rate. In general, they are extensively metabolised by dealkylation, hydroxylation, oxidation and glucuronidation in the liver.

Some metabolites have biological activity; for example nordiazepam from diazepam and oxazepam from temazepam. Detection of benzodiazepines and their metabolites in urine can be used as an indication for use of benzodiazepines.

REAGENTS

Antibody/Substrate Reagent (R₁): Contains monoclonal antibodies benzodiazepines, glucose-6-phosphate (G6P), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), stabilizers, and sodium azide as preservative.

Enzyme-drug Conjugate Reagent (R₂): Contains benzodiazepine-labelled glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in buffer with sodium azide as preservative.

Avoid prolonged exposures of the reagent at temperatures higher than 25°C.

CALIBRATORS AND CONTROLS

Negative Human Urine (Level 0): Contains negative human urine with sodium azide as preservative (Ref.: 933010 and 933015).

Benzodiazepine Calibrator (Ref.: 933080)

Benzodiazepine Calibrator Level 0: Contains negative human urine with sodium azide as preservative.

Benzodiazepine Calibrator Level 1: Contains 100 ng/mL benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative.

Benzodiazepine Calibrator Level 2: Contains 200 ng/mL benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative.

Benzodiazepine Calibrator Level 3: Contains 300 ng/mL benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative.

Benzodiazepine Calibrator Level 4: Contains 1000 ng/mL benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative.

Benzodiazepine Calibrator Low Cut-Off 200: Contains 200 ng/mL Benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative. (Ref.: 933081)

Benzodiazepine Calibrator High Cut-Off 300: Contains 300 ng/mL Benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative. (Ref.: 933082)

Benzodiazepine Control Low Cut-Off 200: Contains 150 and 250 ng/mL Benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative. (Ref.: 936081).

Benzodiazepine Control High Cut-Off 300: Contains 225 and 375 ng/mL Benzodiazepine in human urine with sodium azide as preservative (Ref.: 936082).

PREPARATION

The reagents are ready to use. No reagent preparation is required. All assay components should be stored refrigerated when not in use.

WARNING AND PRECAUTIONS

- This test is for in vitro diagnostic use only. Harmful if swallowed.
- Reagents used in the assay contain sodium azide that may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azide. When disposing such reagents or wastes always flush with a large volume of water to prevent azide build-up.
- Do not use the reagents beyond their expiration dates.
- Keep all containers closed when not in use to avoid microbial contamination.
- Do not mix reagents from different manufacturers.
- Do not freeze reagents.

SPECIMEN COLLECTION

Urine samples may be collected in plastic or glass containers. Benzodiazepines are very thermolabile. If the sample cannot be analyzed immediately, they should be stored refrigerated for up to 3 days. For longer storage keep the sample frozen and then thaw before use. Samples should be brought to room temperature of 18-25°C for testing. Samples with high turbidity should be centrifuged before analysis. Urine samples within the normal pH range of 5-8 can be tested without any pre-treatment. Fresh and properly stored urine samples generally are within this range. Samples with pH out of the range should be adjusted to be within this range with 1M HCl or 1M NaOH before testing.

Adulteration may cause erroneous results. If sample adulteration is suspected, obtain a new sample and both samples should be forwarded to the laboratory for testing.

Handle all urine specimens as if they are potentially infectious.

INSTRUMENTATION REQUIRED

Clinical chemistry analyzers capable of maintaining a constant temperature, pipetting sample, mixing reagents, measuring enzyme rates at 340 nm and timing the reaction accurately can be used to perform this homogeneous immunoassay.

PROCEDURE

Analyzers with above indicated specifications are suitable for performing this homogeneous enzyme immunoassay. Refer to the specific parameter used for each analyzer before performing the assay. Typical assay parameters used for the analyzers include a sample to antibody reagent (R₁) to enzyme conjugate reagent (R₂) ratio of 1:10:3,75 respectively; a 37°C incubation temperature, 2-4 min reading frames, and 340nm primary wavelength.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALIBRATION

For qualitative determinations, the reagent must be calibrated with the selected cut-off calibrator. For semi-quantitative determinations, the reagent can be calibrated with a 5 point calibration curve.

CUT-OFF	Calibrator levels (ng/mL)		Control levels (ng/mL)
	QUALITATIVE	SEMI-QUANTITATIVE	
LOW 200 ng/mL	Level 0 (0) Level 2 (200)	Level 0 (0) Level 1 (100) Level 2 (200) Level 3 (300) Level 4 (1000)	Control - 25% (150) Control + 25% (250)
HIGH 300 ng/mL	Level 0 (0) Level 3 (300)		Control - 25% (225) Control + 25% (375)

Recalibrate each month, when control results are out of specified tolerances, when using different lot of reagent and when the instrument is adjusted.

Benzodiazepines Urine

DoA Liquid Test

INTERPRETATION

For qualitative determinations, the cut-off calibrator (200 or 300ng/mL) of benzodiazepine is used as a reference for distinguishing positive from negative samples. A sample with a change in absorbance ($\Delta A/\text{min}$) equal to, or greater than, that obtained with the cut-off calibrator is considered positive. A sample with a change in absorbance value lower than that obtained with the cut-off calibrator is considered negative.

For semi-quantitative determinations, a calibration curve with multiple calibrators is required. The concentration of benzodiazepines in the sample may then be estimated from the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Good laboratory practices recommend the use of control specimens to ensure proper assay performance.

The calibration curve can be validated with the Control levels 150 and 250 ng/mL (ref. 936081) or levels 225 and 375 ng/mL (ref. 936082), or with commercial controls.

LIMITATIONS

1. A positive result from the assay indicates only the presence of benzodiazepines.
2. Positive results should be confirmed by other affirmative, analytical methods (e.g. chromatography), and preferably GC/MS.
3. The test is designed for use with human urine only.

PRECISION AND SENSITIVITY

Details of the precision and sensitivity studies are available on request.

ACCURACY

52 urine samples from an external quality assurance scheme (UKNEQAS) were tested using GC-MS. The results from all participating laboratories were averaged to give the definitive concentration of drug in the sample. The same 52 samples were analysed using the Liquid EIA and the results compared.

13 samples screened positive by the Liquid EIA, and the same 13 samples were confirmed positive by GC-MS.

38 samples screened negative by the Liquid EIA, and the same 38 samples were confirmed negative by GC-MS.

One sample was positive in the screen, but negative when confirmed. The donor in question was taking clonazepam which was not looked for by the confirmation method. This would explain the discrepancy in results.

SPECIFICITY

Various potentially interfering substances were tested for cross-reactivity with the assay. Test compounds were spiked into the drug-free urine calibrator matrix to various concentrations and evaluated against the cut-off calibrator (300ng/mL).

It is possible that other substance and/or factors not listed below may interfere with the test and cause false positive results.

The following compounds were found to be non-cross reacting at 100,000ng/mL:

11-hydroxy-delta9-THC	EDDP
11-nor9-carboxy-delta9-THC	EMDP
6-Acetyl-Morphine	Ephedrine
Amitriptyline	Heroin
Amobarbital	LAAM
Amphetamine	MBDB
Aspirin	MDA
Benzoylcegonine	MDEA
β -phenylethylamine	MDMA
Cannabidiol	Metadone
Cocaine	Methamphetamine
Codeine	Morphine
Cotinine	Benzodiazepine
Delta9-THC	Paracetamol
Dihydrocodeine	Pseudoephedrine
Ecgonine Methyl Ester	

The following benzodiazepines will produce a positive relative to the 300ng/mL cut-off at the following concentrations:

Compound	Concentration (ng/mL)
Alprazolam	300
Bromazepam	2,000
Chlordiazepoxide	300
Clobazam	2,000
Clonazepam	300
Diazepam	300
Flunitrazepam	300
Flurazepam	300
Lormetazepam	300
Lorazepam	300
Medazepam	300
Midazolam	400
Nitrazepam	300
Prezepam	300
Temazepam	300
Triazolam	300

BIBLIOGRAPHY

1. Urine Testing for Drug of Abuse, National Institute on Drug Abuse (NIDA) Research Monograph 73, 1986.
2. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Program, National Institute on Drug Abuse, Federal Register, vol. 53, No. 69, pp11970 (1988).
3. Rubenstein, K.E., R.S. Schneider, and E.F. Ullman, Homogeneous Enzyme Immunoassay: A New Immunochemical Technique, Biochem Biophys Res Commun, 47, 846 (1972).
4. The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse, Olaf Drummer. Arnold publication ISBN 034076257

PACKAGING

Ref.: 930018 200 tests	Cont.	: 2 x 21 mL R1 : 2 x 8 mL R2
Ref.: 930020 500 tests	Cont.	: 1 x 105 mL R1 : 1 x 38 mL R2
Ref.: 930022 2500 tests	Cont.	: 2 x 250 mL R1 : 1 x 190 mL R2

Benzodiazepinas Orina

DoA Liquid Test

Ensayo de Benzodiazepinas para Orina IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

Inmunoensayo enzimático homogéneo para la determinación cualitativa y cuantitativa de benzodiazepinas en orina humana.

El ensayo solamente proporciona un resultado analítico preliminar. Para confirmar el resultado analítico debe usarse un método químico alternativo más específico. El uso de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS) es el método para confirmar los resultados más utilizado (1, 2). Existen además otros métodos químicos de confirmación. Se deben tener en cuenta las consideraciones clínicas y el criterio profesional en la interpretación de los resultados obtenidos con vistas a establecer un tratamiento o terapia adecuado.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Inmunoensayo Enzimático de benzodiazepina es un ensayo homogéneo (3) con reactivo líquido listo para su uso. El ensayo se basa en la competición entre la droga presente en la muestra y la droga conjugada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PDH) por una cantidad fija del anticuerpo en el reactivo. La actividad enzimática decrece cuando hay unión con el anticuerpo, y la concentración de la droga en la muestra es medida en términos de actividad enzimática.

En ausencia de droga en la muestra, la enzima G6PDH conjugada con la droga se une al anticuerpo, de manera que la actividad enzimática es inhibida. Por otro lado, cuando la droga está presente en la muestra, el anticuerpo se une a la droga libre, de manera que la enzima libre de unión G6PDH muestra su actividad máxima.

La actividad enzimática convierte nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) a NADH, resultando en un cambio de absorbancia que puede ser medido espectrofotométricamente a 340 nm.

SIGNIFICADO DEL TEST

La familia de las benzodiazepinas tiene una estructura química diversa la cual proporciona una amplia gama de propiedades físico-químicas y farmacológicas. Forman un amplio grupo y se utilizan como sedantes y en el tratamiento de la ansiedad. Se estima que cerca de 50 drogas de benzodiazepina son de uso común en todo el mundo, con aproximadamente una docena comercializadas dentro de un mismo país. Las benzodiazepinas están fuertemente asociadas a los consumidores de opiáceos (4).

Generalmente se toman de forma oral (aunque también se usan a través de vías intravenosas e intramusculares) y como se esperaría de un grupo tan diverso, los efectos farmacológicos son amplios y también están relacionados con el índice de absorción. En general, son extensamente metabolizadas en el hígado por procesos de desalquilación, hidroxilación, oxidación y glucuronidación.

Algunos metabolitos tienen actividad biológica; por ejemplo el nordiazepam del diazepam y el oxazepam del temazepam. La detección de benzodiazepinas y de sus metabolitos, en orina, se puede utilizar como indicativo del uso de benzodiazepinas.

REACTIVOS

Reactivo Anticuerpo/Sustrato (R₁): Contiene anticuerpo monoclonal para benzodiazepina, glucosa-6-fosfato (G6P), y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), estabilizadores, y azida sódica como conservante.

Reactivo Conjugado enzima-droga (R₂): Contiene glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) conjugada con benzodiazepinabenzodiazepina en tampón con azida sódico como conservante.

Evitar exposiciones prolongadas del reactivo a temperaturas superiores a 25°C.

CALIBRADORES Y CONTROLES

Orina Humana Negativa (Nivel 0): Contiene orina negativa humana con azida sódica como conservante (Ref.:933010 y 933015).

Calibrador Benzodiazepinas (Ref.:933080):

Calibrador Nivel 0 Benzodiazepinas: Contiene orina humana negativa con azida sódica como conservante.

Calibrador Nivel 1 Benzodiazepinas: Contiene 100 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante.

Calibrador Nivel 2 Benzodiazepinas: Contiene 200 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante.

Calibrador Nivel 3 Benzodiazepinas: Contiene 300 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante.

Calibrador Nivel 4 Benzodiazepinas: Contiene 1000 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante.

Calibrador Benzodiazepinas Cut-off Bajo 200: Contiene 200 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante (Ref.:933081)

Calibrador Benzodiazepinas Cut-off Alto 300: Contiene

300 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante (Ref.:933082)

Control Benzodiazepinas Cut-off Bajo 200: Contiene 150 y 250 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante (Ref.:936081)

Control Benzodiazepinas Cut-off Alto 300: Contiene 225 y 375 ng/mL benzodiazepinas en orina humana con azida sódica como conservante (Ref.:936082)

PREPARACIÓN

Los reactivos están listos para su uso. No se requiere preparación del reactivo. Todos los componentes del ensayo deben conservarse refrigerados.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este test es para diagnóstico in vitro. Nocivo por ingestión.
- La azida sódica puede reaccionar con el cobre o plomo de las tuberías y formar componentes explosivos. En caso de eliminación del producto, hacerlo con abundante agua del grifo.
- No utilizar los reactivos más allá de su fecha de caducidad.
- Mantener todas las botellas cerradas cuando no están en uso para evitar contaminación microbiana.
- No mezclar reactivos de distintos fabricantes.
- No congelar los reactivos.

MUESTRAS

Las muestras de orina se pueden obtener en contenedores de plástico o de vidrio. Algunos plásticos pueden absorber drogas. Las benzodiazepinas son termolábiles. Si la muestra no se puede analizar inmediatamente, se puede guardar refrigerada hasta tres días. Si se desea guardar durante más de 3 días, congelar y descongelar antes de su uso. Las muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) durante el test. Muestras con alta turbidez deben ser centrifugadas antes de su análisis. Las muestras de orina con un pH dentro del rango normal de 5-8 pueden ser utilizadas sin necesidad de pre-tratamiento. Las muestras recientes y conservadas adecuadamente están generalmente dentro de este rango. Las muestras con el pH fuera del rango deben ser ajustadas dentro del mismo, utilizando 1M HCl o 1M NaOH antes de utilizarlas.

La adulteración puede causar resultados erróneos. Si se sospecha de adulteración de la muestra, se debe obtener una muestra nueva y ambas muestras deben ser ensayadas.

Manipular todas las muestras de orina como si fueran potencialmente infecciosas.

MATERIAL ADICIONAL

Analizadores de química clínica capaces de mantener la temperatura constante, pipetear muestra, mezclar reactivos, medir valores enzimáticos a 340 nm y temporizar con precisión el tiempo de incubación, pueden ser usados para este inmunoensayo homogéneo.

PROCEDIMIENTO

Los analizadores con las especificaciones arriba indicadas son adecuados para el presente inmunoensayo enzimático homogéneo. Referirse a los parámetros específicos para cada analizador antes del ensayo. Los parámetros típicos utilizados por los analizadores guardan la relación de 1:10:3,75 (muestra: reactivo 1: reactivo 2), incubaciones a 37°C, tiempos de lectura de 2-4 min y longitud de onda de 340nm.

Spinreact dispone de aplicaciones para distintos analizadores automáticos. Instrucciones para la mayoría de ellos están disponibles bajo demanda.

CALIBRACIÓN

Para determinaciones cualitativas, el reactivo tiene que ser calibrado con el calibrador del punto de corte deseado. Para determinaciones semi-cuantitativas, el reactivo debe ser calibrado con los 5 puntos de calibración indicados a continuación.

CUT-OFF	Niveles Calibrador (ng/mL)		Niveles Control (ng/mL)
	CUALITATIVO	SEMI-CUANTITATIVO	
BAJO 200 ng/mL	Nivel 0 (0) Nivel 2 (200)	Nivel 0 (0) Nivel 1 (100) Nivel 2 (200)	Control - 25% (150) Control + 25% (250)
ALTO 300 ng/mL	Nivel 0 (0) Nivel 3 (300)	Nivel 3 (300) Nivel 4 (1000)	Control - 25% (225) Control + 25% (375)

Recalibrar cada mes, cuando los resultados del control están fuera de especificaciones, cuando se usa diferente lote de reactivo y cuando se ajusta el instrumento.

Benzodiazepinas Orina

DoA Liquid Test

INTERPRETACIÓN

Para determinaciones cualitativas, los calibradores de punto de corte (200 o 300 ng/ml) de benzodiazepina se utilizan como referencia para distinguir muestras positivas y negativas. Una muestra con un incremento de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) igual o mayor que el punto de corte utilizado es considerada positiva. Una muestra con un incremento de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) menor que el punto de corte utilizado es considerada negativa.

Para determinaciones semi-cuantitativas, se requiere una curva de calibración multi-punto. La concentración de benzodiazepinas en la muestra puede ser estimada en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas en laboratorio recomiendan el uso de controles para asegurar el correcto funcionamiento del ensayo.

La curva de calibración puede ser validada con los controles niveles 150 y 250 ng/mL (ref.: 936081) y niveles 225 y 375 ng/mL (ref. 936082), o bien con Controles comerciales.

LIMITACIONES

1. Un resultado positivo del ensayo sólo indica presencia de benzodiazepinas.
2. Los resultados positivos deben ser confirmados por otros métodos analíticos, afirmativos (ej. cromatografía), y preferiblemente GC/MS.
3. El reactivo está diseñado para ser utilizado solamente en orina humana.

PRECISIÓN Y SENSIBILIDAD

Detalles de los estudios de precisión y sensibilidad están disponibles bajo petición.

EXACTITUD

52 muestras de orina de un plan de aseguramiento de calidad externo (UKNEQAS) han sido evaluadas mediante GC-MS. Los resultados de todos los laboratorios participantes se tuvieron en cuenta para establecer una concentración media definitiva de la droga en cada muestra. Las mismas 52 muestras fueron analizadas utilizando el reactivo líquido EIA y se compararon los resultados.

13 muestras resultaron positivas con el reactivo líquido EIA, y las mismas 13 muestras fueron confirmadas como positivas con GC-MS.

38 muestras resultaron negativas con el reactivo líquido EIA, y las mismas 38 muestras fueron confirmadas como negativas con GC-MS.

Una muestra fue positiva en el *screening*, pero negativa al ser confirmada. El donante en cuestión estaba tomando clonazepam, el cual no era objeto de búsqueda por el método de confirmación. Esto explicaría la discrepancia en los resultados.

ESPECIFICIDAD

Para determinar la presencia de reacciones cruzadas en el test, se testaron varias sustancias potencialmente interferentes. Los diferentes compuestos fueron añadidos en orina negativa humana para obtener varias concentraciones de cada compuesto. Estas concentraciones fueron evaluadas en comparación con el punto de corte (300ng/mL).

Es posible que otras sustancias y/o factores no probados en la tabla puedan interferir con el reactivo dando lugar a falsos positivos.

Los siguientes compuestos no mostraron reactividad cruzada a la concentración de 100,000ng/mL:

11-hidroxi-delta9-THC	EDDP
11-nor9-carboxi-delta9-THC	EMDP
6-Acetil-Morfina	Efedrina
Amitriptilina	Heroína
Amobarbital	LAAM
Anfetamina	MBDB
Aspirina	MDA
Benzoilecgonina	MDEA
β -feniletilamina	MDMA
Cannabidiol	Metadona
Cocaína	Metanfetamina
Codeína	Morfina
Cotina	Benzodiazepinas
Delta9-THC	Paracetamol
Dihidrocodeína	Pseudoefedrina
Ecgonina Metil Éster	

Los siguientes compuestos mostraron reactividad cruzada relativa al punto de corte 300 ng/ml a las siguientes concentraciones:

Compuesto	Concentración (ng/mL)
Alprazolam	300
Bromazepam	2,000
Clordiazepóxido	300
Clobazam	2,000
Clonazepam	300
Diazepam	300
Flunitrazepam	300
Flurazepam	300
Lormetazepam	300
Lorazepam	300
Medazepam	300
Midazolam	400
Nitrazepam	300
Prezepam	300
Temazepam	300
Triazolam	300

BIBLIOGRAFÍA

1. Urine Testing for Drug of Abuse, National Institute on Drug Abuse (NIDA) Research Monograph 73, 1986.
2. Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Program, National Institute on Drug Abuse, Federal Register, vol. 53, No. 69, pp11970 (1988).
3. Rubenstein, K.E., R.S. Schneider, and E.F. Ullman, Homogeneous Enzyme Immunoassay: A New Immunochemical Technique, Biochem Biophys Res Commun, 47, 846 (1972).
4. The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse, Olaf Drummer. Arnold publication ISBN 034076257

PRESENTACIÓN

Ref.: 930018 200 tests	Cont.	: 2 x 21 mL R1 : 2 x 8 mL R2
Ref.: 930020 500 tests	Cont.	: 1 x 105 mL R1 : 1 x 38 mL R2
Ref.: 930022 2500 tests	Cont.	: 2 x 250 mL R1 : 1 x 190 mL R2