

1. Zweckbestimmung

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Eosinophil Cationic Protein in Serum. Die Bestimmung von ECP dient als Hilfsmittel bei der Diagnose von allergischen Erkrankungen und der Überwachung einer anti-inflammatorischen Therapie.

Die Bestimmung von ECP mit dem vorliegenden Testkit ist nur in Verbindung mit dem Gold Standard Diagnostics CD Kassel -Testsystem validiert und darf nicht auf anderen Systemen durchgeführt werden (die Leistungsdaten sind nur für die Gold Standard Diagnostics CD Kassel-Testsysteme bestimmt worden). Die Anwendung ist auf Fachpersonal beschränkt, das speziell in Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde, die unter Verwendung von IVDs durchgeführt werden.

Die mit diesem Produkt ermittelten ECP-Werte sollten nur als Hilfsmittel zur Diagnose und Überwachung verwendet werden. Jeder Arzt muss die Ergebnisse auch unter Berücksichtigung der Krankengeschichte, der körperlichen Befunde und andere diagnostische Verfahren berücksichtigen.

2. Einleitung

Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN) und Major Basic Protein (MBP) sind die bekanntesten Proteinmediatoren aus aktivierten Eosinophilen. ECP und EDN kommen in der Granula-Matrix von eosinophilen Granulozyten vor, MBP im Granula-Kern. ECP und EDN gehören zur Ribonuclease A – Familie. ECP und MBP zeichnen sich durch eine hohe Zytotoxizität aus. Aktivierte eosinophile Granulozyten spielen eine große Rolle bei asthmatischen Erkrankungen. Da ECP aus aktivierten eosinophilen Granulozyten abgegeben wird, kann ECP als Marker für eosinophile Aktivierung und Degranulation eingesetzt werden. Der ECP Testkit ist ein hochempfindliches Testsystem zur Messung der ECP-Freisetzung.

3. Test-Prinzip

Der ECP Testkit ist ein Sandwich-ELISA und detektiert humanes ECP mit einer Nachweisgrenze, die bei 0,4 ng/ml liegt. Eine Kreuzreaktivität mit EDN ist nicht beobachtet worden. Die Festphase ist eine Mikrotiterplattenvertiefung, an die ein Anti-human-ECP Antikörper (monoklonal) gebunden ist. Im ersten Schritt wird Patienten- bzw. Standardserum in die Mikrotiterplattenvertiefung pipettiert. Es entsteht eine Bindung des ECP an das festphasen-gebundene Anti-human-ECP. Nach einem Waschschriff wird ein mit Meerrettich-Peroxidase markierter Anti-human-ECP Antikörper (polyklonal) in die Mikrotiterplattenvertiefung pipettiert. Es entsteht eine enzymatische Aktivität entsteht aus dem Substrat eine gefärbte Lösung. Anschließend wird die enzymatische Reaktion durch Hinzugabe einer Stopplösung beendet. Die Menge des gebundenen markierten Anti-human-ECP Antikörpers ist proportional zur Menge des freigesetzten ECP. Die Messung erfolgt im Photometer bei 450 nm. Aus den gemessenen Kalibrierseren wird eine Kalibrierkurve erstellt. Die Berechnung der Patientenwerte erfolgt anhand der Kalibrierkurve.

4. Inhalt ECP Testkit

- [CONJ.] Konjugat:** 1 Flasche mit 15 ml polyklonalem Anti-human-ECP Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase in gepufferter Eiweißlösung. Enthält 1 % BSA. Konservierungsmittel: 0,15 % ProClin 150
- [WASH] 20x Waschlösung (Konzentrat):** 1 Flasche mit 100 ml Waschlösungskonzentrat mit T-PBS (Herstellung der Waschlösung siehe unter Punkt 10.6.)
- [SUBS] Substratlösung:** 1 Flasche mit 20 ml Tetramethylbenzidin/ H₂O₂.
- [STOP] Stopplösung:** 1 Flasche mit 20 ml 0,5 M Schwefelsäure.
- [DIL] AS Verdünnungslösung:** 1 Flasche mit 50 ml Verdünnungslösung, enthält 1 % Ziegen Serum. Konservierungsmittel: 0,1 % Natriumazid.
- [CAL] [SERUM] ECP-Kalibrierreihe:**
5 Flaschen mit je 1,3 ml Serum mit verschiedenen Konzentrationen ECP (0,4; 1,2; 4; 12; 40 ng/ml). Enthält 1 % Ziegen Serum. Konservierungsmittel: 0,09 % Natriumazid.
[CAL] [SERUM] 1 Kalibrator 1 = 0,4 ng/ml;
[CAL] [SERUM] 2 Kalibrator 2 = 1,2 ng/ml;
[CAL] [SERUM] 3 Kalibrator 3 = 4,0 ng/ml;
[CAL] [SERUM] 4 Kalibrator 4 = 12 ng/ml;
[CAL] [SERUM] 5 Kalibrator 5 = 40 ng/ml.

- [MTP] Mikrotiterstreifen:** 12 Mikrotiterstreifen (einzeln herausnehmbar) mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit Anti-human-ECP Antikörper.

5. Zusätzlich erforderliche Materialien und Geräte

Materialien und Geräte:

- Mikropipette mit Einmalspitzen 50 µl und 100 µl
- Manueller Handdispenser z.B. Eppendorf-Multipette mit Combitips 5 ml
- Meßzylinder 1000 ml
- Klebefolie bzw. Mikrotiterplattendecke
- Mikrotiterplatten (unbeschichtet, Flachboden) Greiner
- Einmalhandschuhe
- Variable 8-Kanal-Pipette (100 µl) mit Einmalspitzen
- Destilliertes Wasser
- Stoppuhr
- Drucker
- Mikrotiterplattenphotometer 450 nm (z.B. TECAN-Spectra oder TECAN-Sunrise)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (z.B. TECAN Columbus/ Hydroflex)
- Vacutainer SST-Blutabnahmeröhrchen (Becton Dickinson) oder S-Monovette mit Serumgel (Sarstedt)
- Laborzentrifuge

6. Grenzen des Verfahrens

- Verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse werden nur dann erhalten, wenn der Test ordnungsgemäß (siehe Testdurchführung Kapitel 10) durchgeführt wird.
- Pro Mikrotiterplatte ist eine ECP-Kalibratorreihe mitzuführen.
- Der Nachweis erhöhter ECP-Werte beweist lediglich eine verstärkte Aktivierung von Eosinophilen. Die klinische Diagnose muß weitere Daten zur möglichen Diagnose einbeziehen.
- Positive Resultate bei ECP In-vitro-Tests müssen nicht zwangsläufig mit klinischen Manifestationen einhergehen.
- Falsch überhöhte bzw. erniedrigte ECP-Werte können u.a. vorkommen wenn:
 - falsche Blutabnahmeröhrchen benutzt werden;
 - die Gerinnungszeit nicht genau eingehalten wurde;
 - die Gerinnungstemperatur nicht genau eingehalten wurde;
 - die Serumüberführung in ein neues Röhrchen nicht bzw. nicht rechtzeitig erfolgt ist.
- Die Freisetzung von ECP kann durch Kortikosteroid-Therapie (s. Literatur 5) und ggf. von Zytostatika und immunsupprimierenden Arzneimitteln beeinträchtigt werden.

7. Spezifische Leistungsdaten

- Analytische Empfindlichkeit
Der LOQ, der als CV von 20 % angegeben wurde, beträgt 0,48 ng/mL.
 - Analytische Spezifität
Eine Kreuzreaktion mit EDN (Eosinophil-derived Neurotoxin), einem funktional verwandten Protein, ist bis zu einer Konzentration von 500 ng/ml nicht beobachtet worden.
 - Richtigkeit 87 % (Übereinstimmung mit ImmunoCAP ECP)
 - Wiederholbarkeit (Intra-Assay) < 15 VK %*
 - Reproduzierbarkeit (Inter-Assay) < 15 VK %*
 - Reproduzierbarkeit (Inter-Lot) im Mittel 15 VK %*
 - Messbereich 0,4 - 40 ng/ml
 - Rückführbarkeit ECP-Kalibratorreihe durch Proteinbestimmung des gereinigten ECP über UV-Absorption.
- * = auf Basis ng/ml

Auf Anfrage können weitere Leistungsdaten von Gold Standard Diagnostics CD Kassel GmbH zur Verfügung gestellt werden.

8. Einschränkungen und Interferenzen

Ikterus	0 - 18,3 mg/dl Bilirubin F – ohne Beeinträchtigung 0 - 19,0 mg/dl Bilirubin C – ohne Beeinträchtigung bis 1112 Units (FTU)
Chylus	– ohne Beeinträchtigung
Rheumafaktor	0 - 500 IU/ml – ohne Beeinträchtigung

Auch schwach hämolytische Seren nicht verwenden!
Hochgradig lipämische Seren nicht verwenden!

9. Probengewinnung und -lagerung

Die ECP-Konzentrationen können durch Probengewinnung und -lagerung beeinflusst werden. Eine Freisetzung von ECP aus eosinophilen Granulozyten kann unter Umständen auch bei der Blutgerinnung auftreten. **Die nachfolgende Probengewinnung und -lagerung ist deshalb unbedingt einzuhalten!**

Zur Blutabnahme sind die Vacutainer SST-Blutabnahmeröhrchen (mit Trenngel, z.B. Bestellnummer 366444) der Firma Becton Dickinson, Heidelberg oder die Sarstedt S-Monovette (mit Serumgel, z.B. Bestellnummer 02.1388.001) zu benutzen. Nach Aufnahme des Blutes in das Blutabnahmeröhrchen ist der Inhalt durch 6-maliges Schwenken um 180 ° zu durchmischen. Jede Variation von Temperatur, Zeit oder Serumröhrchen führt zu einer Veränderung der ECP-Freisetzung und kann die Werte verfälschen. Das Blut muß nach Entnahme **exakt 60 min** zur Gerinnung an einem erschütterungsfreien Ort bei 20 – 24 °C stehen. Direkte Sonneneinstrahlung und die Nähe von Heizkörpern sind zu vermeiden! Sofort danach muß das Blut bei 1200 g (Erdbeschleunigung g = 9,81 m/s²) für **exakt 10 min** zentrifugiert werden.

Unmittelbar nach der Zentrifugation, spätestens jedoch nach einer Stunde muß das Serum in ein neues Röhrchen (Glas oder Polystyrol ohne Trenngel oder sonstige Zusätze) überführt werden.

Für Versandzwecke ist das so gewonnene Serum bei Raumtemperatur 24 Stunden haltbar. Wird die Bestimmung später durchgeführt, muß das Serum bei – 20 °C oder tiefer eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden!

10. Durchführung des Analyseverfahrens

1. Alle Testkomponenten müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (RT, 20 – 25 °C) gebracht werden. Während des gesamten Testlaufs muß diese Temperatur eingehalten werden.
2. Alle Mikrotiterstreifen, die nicht sofort gebraucht werden, müssen in den Originalbeutel zurückgegeben werden, der zur Vermeidung von Feuchtigkeitsabsorption dicht zu verschließen ist. Gebrauchte Mikrotiterstreifen sind zu entsorgen.
3. Den Testkit nicht direkter Sonneneinstrahlung aussetzen.
4. Die Mikrotiterstreifenvertiefungen sollen während des Testlaufs nicht vollständig austrocknen.
5. In den Mikrotiterstreifenvertiefungen sollen keine Verunreinigungen sein. Vor der Messung muß sichergestellt werden, daß sich keine Luftblasen in den Vertiefungen befinden.
6. Zubereitung der Waschlösung: In einem Meßzylinder werden 50 ml Waschlösungskonzentrat mit dest. Wasser auf 1000 ml verdünnt und gut vermischt. Die Waschlösung (Konzentrat) kann bei einer Lagertemperatur von 2 – 8 °C eine leichte Trübung bzw. einen Bodensatz aufweisen. Achten Sie beim Ansetzen der Waschlösung auf vollständige Auflösung der Trübungen bzw. des Bodensatzes. Diese Lösung reicht für eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen. Nach Verdünnung ist die Waschlösung

bei Verwendung gründlich gereinigter Gefäße 2 Wochen bei 4 °C haltbar.

- Verdünnung der Proben: 50 µl Serum werden mit 200 µl Verdünnungslösung verdünnt (Verdünnungsverhältnis 1+4). Dazu werden in jede Vertiefung einer **unbeschichteten** Mikrotiterplatte zuerst 50 µl Serum und anschließend 200 µl Verdünnungslösung pipettiert. Die Positionen für Blank und Kalibrator müssen freigelassen werden, da anschließend eine Überführung der verdünnten Seren in die gleichen Kavitäten der **beschichteten** Mikrotiterplatte erfolgen soll. Die Kontrollproben werden ebenso wie die Patientenproben verdünnt.
- Nun erfolgt die Pipettierung der Kalibratoren und des **verdünnten Serums** in die **beschichteten** Mikrotiterstreifen: Die Kavität A1 wird als Blank benutzt. Diese Kavität bleibt leer. Je 100 µl der **unverdünnten Kalibratoren 1 – 5** werden in Doppelbestimmungen in die entsprechenden Kavitäten pipettiert (B1 – C2). Dann werden mit einer 8-Kanal-Pipette die verdünnten Seren von der **unbeschichteten** Mikrotiterplatte in die **beschichtete** überführt. Dabei muß die Überführung der verdünnten Seren in die gleichen Positionen erfolgen. Beispiel zu den Punkten 7 und 8 (Doppelbestimmung Kalibratoren – Einfachbestimmung Proben): Für die Verdünnung der Patientenserum wird eine **unbeschichtete** Mikrotiterplatte benutzt. Die Positionen A1 für den Blank und die Positionen B1 bis C2 für die Kalibratoren bleiben frei. Ab den Positionen D2 werden je 50 µl Serum und je 200 µl Verdünnungspuffer pipettiert. Anschließend wird die Pipettierung in einer **beschichteten** Mikrotiterplatte (Mikrotiterstreifen) durchgeführt. Die Kavität A1 bleibt leer (Blank). In die Kavitäten B1 und C1 werden je 100 µl **unverdünnter** Kalibrator 1 pipettiert. In die Kavitäten D1 und E1 werden je 100 µl **unverdünnter** Kalibrator 2 pipettiert usw. bis zum Kalibrator 5, der in Kavität B2 und C2 pipettiert wird. Anschließend werden mit einer 8-Kanal-Pipette je 100 µl **verdünntes** Serum aus der Mikrotiterplatte, in der die Verdünnungen durchgeführt worden sind, in die **beschichteten** Mikrotiterstreifen pipettiert. Dabei werden die verdünnten Seren aus den korrespondierenden Mikrotiterkavitäten überpipettiert d.h., im ersten Schritt werden aus den Kavitäten D2 bis H2 100 µl verdünntes Serum in die Kavitäten D2 bis H2 der beschichteten Mikrotiterplatte (Mikrotiterstreifen) pipettiert. Im nächsten Schritt werden aus den Kavitäten A3 bis H3 mit der 8-Kanal-Pipette je 100 µl verdünntes Serum in die Kavitäten A3 bis H3 der beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert etc.
- Mikrotiterplatte bedecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubieren.
- Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten entweder mit dem automatischen Waschgerät TECAN Columbus/Hydroflex (4x) oder mit dem manuellen Waschgerät (5x) waschen, bitte unbedingt dabei Bedienungsanweisung beachten! Es dürfen nur die von Gold Standard Diagnostics CD Kassel freigegebenen Waschprozeduren benutzt werden.
- Jeweils 100 µl Konjugatlösung direkt in die Vertiefungen pipettieren, jedoch nicht in den Substratleerwert. Dann wird die Mikrotiterplatte wieder bedeckt. 60 min bei RT inkubieren.
- Waschen wie unter Punkt 10.10 beschrieben.
- Jeweils 100 µl Substratlösung in sämtliche Vertiefungen pipettieren. Mikrotiterplatte wieder abdecken und unter Lichtausschluß 10 min inkubieren.

- In der gleichen Weise und Reihenfolge wie beim Pipettieren der Substratlösung jetzt jeweils 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen geben.
- Die Mikrotiterplatte bei 450 nm im Photometer messen. Die Messung sollte innerhalb von 10 min nach Abstoppen der Reaktion stattfinden.

11. Berechnung

- Mittelwerte der Extinktionen der Kalibrierseren berechnen.
- Manuell kann die Kalibrierkurve erstellt werden, indem die für die Kalibratoren ermittelten Extinktionen gegen die Konzentrationen der jeweiligen Kalibrierseren (in ng ECP/ml) auf halb-logarithmischem Papier aufgetragen und die einzelnen Punkte mit einem Lineal verbunden werden. Diese Kalibrierkurve dient zur Ermittlung der Werte der Serumproben. Die Extinktionen der Untersuchungsproben werden mit denen der Kalibrierseren verglichen. Dabei Verdünnungsfaktor beachten! Bei Verdünnung wie unter Kapitel 10.7 die ermittelten Werte mit 5 multiplizieren. Bei Geräten von Gold Standard Diagnostics CD Kassel erfolgt die Berechnung der Standardkurve und die Auswertung der Meßergebnisse automatisch. Dabei wird die gleiche Auswertekette verwendet, wie sie bei der manuellen Methode angewandt wird.

Achtung! Sind wesentliche Änderungen am Testablauf vorgenommen worden (z. B. Zeit, Abfolge, Temperatur etc.) oder sind auch bei korrekter Anwendung wesentliche Beeinträchtigungen der Analysenleistung zu sehen (z. B. Kontrollserenwerte außerhalb des erlaubten Bereiches, stark differierende Doppelwerte etc.), so dürfen die erhaltenen Werte nicht weiter verwendet werden. Eine Überprüfung des Systems bzw. der Abarbeitung ist vor der Fortführung der Arbeiten unbedingt nötig. Bitte wenden Sie sich dazu in Zweifelsfällen an die Fachmitarbeiter/innen von Gold Standard Diagnostics CD Kassel.

12. Normalwerte für ECP

- Werte < 16 ng ECP/ml (Siehe auch Kapitel 6. „Grenzen des Verfahrens“ und Literatur 1)

13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Folgende Regeln müssen beachtet werden:

- Beim Umgang mit den Testbestandteilen sind die einschlägigen Sicherheitsvorschriften zu beachten!
- Kalibratoren, Verdünnungslösung und Untersuchungsmaterialien stellen potentiell infektiöse Substanzen dar. Zwecks Desinfektion kontaminierter Bereiche sind geeignete Mittel/Verfahren einzusetzen.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. Bei Berührung mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort Giftnormierungszentrum oder Arzt anrufen. Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- Das Konjugat enthält ProClin 150 (0,15%) als Konservierungsmittel und muss mit Vorsicht gehandhabt werden. Nicht einnehmen und nicht mit der Haut oder den

Schleimhäuten in Berührung kommen lassen. ProClin 150 kann eine allergische Hautreaktion hervorrufen.

- Das Substrat enthält TMB. TMB kann Reizungen oder Trockenheit der Haut verursachen.
- Im Labor sind Rauchen, Essen und Trinken untersagt.
- Pipetten nicht mit dem Mund ansaugen!
- Alle Reagenzien nach Gebrauch wieder verschließen. Die Verschlüsse dürfen nicht vertauscht werden.
- Beim Pipettieren Kreuzkontamination verhindern!
- Es dürfen keine Testkomponenten unterschiedlicher Chargen miteinander gemischt werden.
- Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr eingesetzt werden.
- Die Messungen und Qualitätskontrollen sollten analog ablaufen, um die Gleichförmigkeit der Testbedingungen abzusichern.
- Funktionalität und Genauigkeit der verwendeten Geräte (Pipetten, Photometer etc.) müssen regelmäßig überprüft werden. Die Anweisungen des Herstellers müssen beachtet werden!
- Jeder schwerwiegende Vorfall, der sich im Zusammenhang mit diesem Produkt ereignet hat, sollte dem Hersteller und der Aufsichtsbehörde des Landes, in dem der Anwender und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.
- Reagenzien und Chemikalien müssen gemäß geltender Bestimmungen behandelt und entsorgt werden. Liste der Stoffe, die bei der Entsorgung ggf. besonders behandelt werden müssen:
 - Konjugat** (Bovines Serumalbumin CAS 90604-29-8) enthält organische Lösungsmittel)
 - Verdünnungslösung** (Ziegenserum; Natriumazid < 0,1 % w/w CAS 26628-22-8)
 - Stopplösung** (Schwefelsäure 0,5 M CAS 7664-93-9)
 - Kalibrierseren** (Ziegenserum; Natriumazid < 0,1 % w/w CAS 26628-22-8)

14. Qualitätskontrolle

- Interne Qualitätskontrolle**
Es wird empfohlen, bei jedem Testansatz mindestens ein Positiv-Kontrollserum **wie Patientenserum im Test einzusetzen**. Wenn sich die Kontrolle im Normbereich befindet, so kann davon ausgegangen werden, daß die Testmethode korrekt arbeitet. Folgende Kriterien sind einzuhalten:
Blankwert: Extinktion < 0,10
Standard 40 ng/ml: Extinktion > 1,50
Es wird empfohlen eine Qualitätsregelkarte zu führen.
- Externe Qualitätskontrolle**
Es wird empfohlen, an externen Qualitätskontrollen (Ringversuch) teilzunehmen. Dabei werden von einem Ringversuchsveranstalter Proben versandt, deren analytische Konzentrationen dem an der externen Qualitätskontrolle teilnehmenden Labor unbekannt sind. Der Ringversuchsveranstalter wertet nach Sammlung der Ergebnisse aller Einsender die Resultate aus und beurteilt sie. Einzelheiten müssen vom Ringversuchsveranstalter erfragt werden. Bitte wenden Sie sich an Gold Standard Diagnostics CD Kassel bzw. den In-vitro Außendienst.

15. Lagerung des Testkits

2 – 8 °C

16. Haltbarkeit

Das Testkit erfüllt seine Spezifikation bis zum angegebenen Verfallsdatum des Testkits und der Komponenten. Das Verfallsdatum ist der letzte Tag des auf dem Testkit oder Komponenten angegebenen Monats. Nach dem ersten Öffnen sind die Bestandteile des Kits bis zu 3 Monate bei 2-8 °C haltbar. Keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums benutzen.

17. Literatur

- Gleich, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3146-3150, (1986)
- Krisjansson, S., et al., Annals of medicine 28, 395-399, (1996)
- Peterson, C., et al., Eur. J. Haematol., 40, 415-423, (1988)
- Zimmerman, B., et al., Clin. Exp. Allergy, 23, 564-570, (1993)
- Ren-Bin Tang, et al., Pediatric Pulmology 31, 121-125 (2001)
- Kirchbach, G. von, et al., Allergologie Nr. 12, 491-497 (2005)

18. Gültigkeit

Diese Arbeitsanleitung ist ab 01.12.2021 gültig.

19. Bestellinformation

	Bestellnummer
ECP - Testkit	REF 36061000
Positivkontrolle	REF 36061002
Negativkontrolle	REF 36061003

20. Hersteller/Vertreiber

Gold Standard Diagnostics CD Kassel GmbH

Otto-Hahn-Straße 16
D-34123 Kassel – Germany
☎ +49 561 491742 0
Fax +49 561 491742 20

Gold Standard Diagnostics Kassel GmbH

Otto-Hahn-Straße 16
D-34123 Kassel – Germany
☎ +49 561 491742 0
Fax +49 561 491742 20