

VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot

(T. pallidum IgG LINE-16)

Références : WE150G16

(T. pallidum IgG LINE-32)

Références : WE150G32

VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot

(T. pallidum IgM LINE-16)

Références : WE150M16

(T. pallidum IgM LINE-32)

Références : WE150M32

POUR USAGE IN VITRO SEULEMENT

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Sommaire

1.	Usage prévu	3
2.	Principe du test.....	3
3.	Contenu	3
3.1	Kit pour 16 déterminations	3
3.2	Kit pour 32 déterminations	3
4.	Stockage et conservation du kit et des réactifs	3
5.	Mesures de précaution et mises en garde.....	4
6.	Matériel supplémentaire requis (non fourni)	4
7.	Echantillons	5
8.	Réalisation du test	5
8.1	Préparation des échantillons.....	5
8.2	Préparation des réactifs	5
8.3	Réalisation du test.....	5
8.4	Automatisation du test.....	6
9.	Interprétation du test	6
9.1	Interprétation des échantillons des patients.....	7
9.2	Utilisation du contrôle cut-off.....	7
9.3	Signification des antigènes	7
9.4	Critères d'interprétation	7
9.5	Limites du test	8
10.	Littérature	8
11.	Schéma du déroulement du test.....	9

1. Usage prévu

Le kit Line Immunoblot est destiné à la détection qualitative et semi-quantitative d'anticorps IgG ou IgM anti-*Treponema pallidum* dans le sérum humain. Le kit peut être utilisé comme test de confirmation lors d'un diagnostic approfondi si le résultat du test de détection est incertain ou positif.

2. Principe du test

Par un procédé spécial de pulvérisation, on transfère les protéines de l'antigène de l'agent pathogène sur une membrane en nitrocellulose. La membrane de nitrocellulose est ensuite coupée en bandelettes individuelles.

L'incubation des bandes de nitrocellulose qui contiennent des antigènes avec des échantillons de sérum/plasma humains permet la mise en évidence d'anticorps spécifiques présents. Les éventuels anticorps présents constituent un complexe immun avec l'antigène fixé sur la bandelette. Les anticorps non liés sont éliminés par lavage. Les bandelettes sont ensuite incubées avec les conjugués anti-humains marqués à la phosphatase alcaline. L'excès est éliminé par lavage. La mise en évidence des réactions est réalisée par l'ajout d'un substrat, incolore initialement, qui permettra de visualiser les bandes antigéniques de couleur bleu-violet. La réaction enzyme/substrat est arrêtée en lavant les bandelettes à l'aide d'eau distillée/désionisée. En fonction des bandes observées, on peut conclure que l'on est en présence ou non d'anticorps IgG ou IgM spécifiques.

3. Contenu

3.1 Kit pour 16 déterminations

- | | | |
|--|------------|----------------|
| 1. Bandelettes de test en IgG ou IgM nitrocellulose avec antigènes appliqués par pulvérisation, renforcées par un film, ordonnées dans un carnet, prêtes à l'emploi | 1 x | 16 bandelettes |
| 2. Contrôle cut-off des IgG ou des IgM , sérum humain, prédilué | 1 x | 1,0 ml |
| 3. Tampon de dilution/lavage , pH 7,3 (concentr. 10x), avec conservateur et Tris | 1x | 50 ml |
| 4. Conjugué IgG ou IgM (concentr. 100x)
conjugué phosphatase alcaline (chèvre) anti-humain, avec conservateur | 1 x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), prêt à l'emploi | 1 x | 57 ml |
| 6. Fiche-journal d'interprétation , pour la consignation et l'archivage des résultats. | 1 x | 1 unité. |

3.2 Kit pour 32 déterminations

- | | | |
|--|------------|----------------|
| 1. Bandelettes de test en IgG ou IgM nitrocellulose avec antigènes appliqués par pulvérisation, renforcées par un film, ordonnées dans un carnet, prêtes à l'emploi | 2x | 16 bandelettes |
| 2. Contrôle cut-off des IgG ou des IgM , sérum humain, prédilué | 1 x | 1,0 ml |
| 3. Tampon de dilution/lavage , pH 7,3 (concentr. 10x), avec conservateur et Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Conjugué IgG ou IgM (concentr. 100x)
conjugué phosphatase alcaline (chèvre) anti-humain, avec conservateur | 1 x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), prêt à l'emploi | 1 x | 57 ml |
| 6. Fiche-journal d'interprétation , pour la consignation et l'archivage des résultats. | 1 x | 1 unité |

Disponible en supplément sur demande :

IgG ou IgM- Contrôle positif, sérum humain, prédilué, 0,5 ml.

Vous trouverez les bandes positives > bandes cut-off dans le certificat joint à la livraison.

(Réf. : IgG : WE150P60 ou IgM : WE150P80)

IgG/IgM- Contrôle négatif, sérum humain, prédilué, 0,5 ml.

Le contrôle négatif ne présente pas de bandes ou tout au moins pas de bandes $\geq$ bandes cut-off pertinentes pour l'évaluation.

(Réf. : IgG/IgM : WE150N10)

4. Stockage et conservation du kit et des réactifs

Conserver le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle qualité.

1. Ne pas congeler les réactifs, ni les exposer à des températures élevées.

2. Ne pas utiliser les réactifs après l'expiration de la date de péremption.
3. Eviter de stocker les réactifs dans un lieu où ils sont soumis à une forte lumière.
4. Le substrat BCIP/ NBT en solution est photosensible et il doit être conservé à l'abri de toute lumière.
5. **Bandelettes de nitrocellulose** : utiliser les bandelettes immédiatement après les avoir sorties de leur sachet. Refermer hermétiquement le sachet et stocker celui-ci à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour archiver les résultats, il est impératif de tenir les bandelettes à l'abri de tout rayonnement direct du soleil afin éviter que les bandes ne se décolorent.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Bandes de test	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni)	3 mois
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	env. 6 h
Substrat	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +8° C	4 semaines
	Dilué final (prêt à l'emploi)	ou température ambiante	2 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums de contrôle utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les sérums de contrôle, les échantillons, les échantillons dilués, les conjugués et les bandelettes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Lors de la réalisation des tests, porter des gants à usage unique et utiliser une pincette en plastique pour manipuler les bandelettes.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.
4. Les bacs d'incubation ont été conçus par le fabricant pour n'être utilisés qu'une seule fois. Le fabricant décline toute responsabilité s'ils sont utilisés plusieurs fois. Dans le cas d'une réutilisation éventuelle, il est recommandé de les désinfecter après utilisation en les laissant tremper plusieurs heures dans une solution d'eau de javel à 1 % (hypochlorite de sodium), de les nettoyer et de les rincer à fond à l'eau du robinet et à l'eau distillée/désionisée.

6. Matériel supplémentaire requis (non fourni)

1. Bac d'incubation (peut être commandé en fonction des besoins ; référence du produit : WE300.08)
2. Agitateur (vertical non centrifuge)
3. Une pissette d'eau déminéralisée /désionisée
4. Pipette ou dispositif de lavage des mains
5. Micropipettes de 5 µl à 1500 µl
6. Pointes de pipette
7. Tubes à échantillons de 2 à 20 ml
8. Pince en plastique
9. Eau distillée ou désionisée
10. Papier filtre

7. Echantillons

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

8. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est une condition essentielle à l'obtention de résultats corrects.

8.1 Préparation des échantillons

1. 15 µl de sérum ou de plasma sont nécessités par échantillon de patient.
2. Les échantillons sanguins doivent être prélevés de manière aseptique par ponction veineuse. Il faut séparer le sérum après coagulation complète (ce qui n'est pas le cas pour le plasma). Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés à -20 °C.
3. Eviter de congeler et décongeler les sérums plusieurs fois.
4. Ne pas utiliser de sérums ayant été inactivés par la chaleur, ni de sérums hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, car ils pourraient engendrer l'obtention de résultats erronés.
5. Ne pas utiliser les échantillons sériques opaques (surtout après la décongélation) ; le cas échéant, les centrifuger (5 minutes à 1 000 g), pipeter le surnageant translucide et l'utiliser pour le test.

8.2 Préparation des réactifs

1. Afin de simplifier la routine des travaux de laboratoire, les mêmes temps d'incubation et les mêmes composantes (si les temps d'incubation et les composantes sont communs aux tests) peuvent être utilisés pour tous les LINEs et EcoBlots. L'utilisation des contrôles cut-off s'effectue de façon spécifique aux paramètres et au lot.
2. Avant de diluer chacun des réactifs, amener le concentré correspondant à la température ambiante. Utiliser uniquement de l'eau distillée/désionisée de qualité élevée et à température ambiante.
3. Bien homogénéiser les dilutions d'échantillons avant de réaliser le test.
4. **Tampon de dilution et de lavage**
Diluer le tampon de dilution et de lavage concentré (10X) au 1/10 avec de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir une solution de lavage 1X (10ml/50ml/100ml de tampon concentré + 90ml/450ml/900ml d'eau dist./désionisée) et bien mélanger.
Les tampons de dilution/de lavage concentrés et dilués sont susceptibles de présenter une coloration jaune. Celle-ci n'a aucune influence ni sur la durée de conservation du tampon de dilution/de lavage, ni sur le fonctionnement et la validité diagnostique du dosage.
5. **Conjugué IgG ou IgM**
Ajouter 1 volume de conjugué phosphatase alcaline IgG ou IgM (100x) dans 100 volumes de tampon de dilution et de lavage préparé 1X. 1,5 ml de solution de conjugué sont nécessaires pour chaque échantillon de sérum. Voir le tableau de dilution du conjugué (point « Schéma de déroulement du test »).
6. **Substrat**
Le substrat est prêt à l'emploi.

8.3 Réalisation du test

Attention : Les bandelettes de test en nitrocellulose ne doivent être testées que dans la classe d'Ig spécifiée (voir l'étiquette apposée sur le carnet de l'innunmoempreinte ainsi que la désignation indiquée sur chacune des bandelettes de test).

Pour une réalisation et une interprétation correctes du test *Treponema pallidum* LINE, il est impératif d'utiliser un contrôle cut-off spécifique aux paramètres et au lot pour chaque test.

**Pour obtenir un diagnostic sûr des *Treponema pallidum*, réaliser l'LINE
pour les IgG et pour les IgM.**

1. Effectuer le test à température ambiante.
2. Pour chaque échantillon, déposer une bandelette dans la rainure d'un bac d'incubation propre. Dans la mesure du possible, saisir les bandelettes uniquement au niveau de leur extrémité portant un marquage.
3. Pour chaque bandelette, déposer 1,5 ml de **tampon de dilution et de lavage** prêt à l'emploi et placer le tout sur l'agitateur **pendant 1 minute**. Veiller à ce que les bandelettes soient recouvertes de liquide de façon homogène ; les bandelettes ne doivent pas sécher pendant toute la durée du test.
4. Les bandelettes de test en nitrocellulose renforcée sont complètement humidifiées au bout d'une minute et elles peuvent être incubées à plat sur leur face avant ou sur leur face arrière, ou bien en position latérale.
5. Dans la mesure du possible, y pipetter **15 µl de sérum/plasma du patient** resp. **100 µl du contrôle cut off / positif / négatif**, au bord supérieur de la fin de la bande marqué. Incuber pendant **30 minutes** sur l'agitateur. Pendant le pipetage et lorsque l'on dépose les produits, veiller à ce qu'aucune contamination croisée des différents échantillons n'ait lieu.
6. Aspirer la totalité du liquide, avec beaucoup de précaution. Les bandelettes restent collées au fond des rainures. Egoutter le liquide restant sur un papier absorbant.
7. **Laver** les bandelettes : déposer 1,5 ml de tampon de dilution et de lavage puis incuber . Au total seront **effectués 3 lavages de 5 minutes** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou faire égoutter la totalité du tampon de dilution. Avant la fin du dernier lavage, préparer la quantité nécessaire de dilution fraîche de conjugué (voir le tableau).
8. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler (voir le point 6).
9. Sur chacune des bandelettes, déposer 1,5 ml de la dilution de conjugué et incuber le tout pendant **30 minutes** sur l'agitateur.
10. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler.
11. **Laver** les bandelettes : incuber chacune des bandelettes avec 1,5 ml de tampon de dilution et de lavage : **3 x 5 minutes au total** sur l'agitateur. Toujours aspirer ou faire égoutter la totalité du tampon de dilution. Rincer ensuite **une fois pendant une minute** avec de l'eau distillée/désionisée.
12. Aspirer la totalité du liquide des rainures, ou bien le faire s'écouler (voir le point 6).
13. Déposer 1,5 ml de **substrat en solution** prêt à l'emploi dans chacune des rainures et laisser se développer la coloration sur l'agitateur pendant **10 ± 3 minutes**.
14. **Arrêter** le développement de la couleur en éliminant des rainures le substrat en solution. Laver ensuite les bandelettes **trois fois** sans incubation i. Pour chaque lavage, utiliser 1,5 ml d'eau **distillée/désionisée**.
15. Faire égoutter l'eau distillée/désionisée et faire sécher les bandelettes sur un papier absorbant propre. La coloration de l'arrière-fond que l'on peut observer lorsque les bandelettes sont humides disparaît complètement lorsque les bandelettes sont sèches.
16. Utiliser le protocole d'évaluation ci-joint pour l'interprétation des résultats. Les informations des bandes très spécifiques inscrites sur la fiche-journal facilitent l'interprétation des résultats des échantillons des patients.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page
--

8.4 Automatisation du test

Pour l'exécution automatisée des blots et des LINE, les appareils suivants sont validés : Apollo et ProfiBlot. En principe, tous les automates blot courants sont adéquats.

9. Interprétation du test

Pour garantir une interprétation sûre, chaque bandelette LINE est dotée de deux contrôles.

1. **Contrôle sérique** (= serum control) :

La bande d'incubation sérique n'apparaît en dessous de la ligne de marquage (= markline) qu'après l'incubation avec le sérum patient.

2. **Contrôle de conjugué** (= conjugate control) :

La bandelette LINE a une bande de contrôle du conjugué qui apparaît avec le conjugué correspondant après l'incubation.

Le test est valide si le contrôle sérique et le contrôle interne du conjugué sont clairement visibles sur la bandelette.

Se reporter à la fiche d'interprétation pour obtenir des informations sur la position de la bande de contrôle sérique/de conjugué.

9.1 Interprétation des échantillons des patients

Se reporter à la fiche-journal pour obtenir des informations sur la position et la désignation de la bande réactive.

Bandes IgG à IgM : TpN47, TmpA, TpN17, TpN15

9.2 Utilisation du contrôle cut-off

Les bandes dont l'intensité est plus faible que celle de la bande cut-off (TpN 47) du contrôle cut-off ne seront pas prises en compte dans l'interprétation. La bande TpN47 doit obligatoirement afficher une intensité faible.

Evaluation des intensités des bandes :

Bande TpN 47 : L'intensité de la bande TpN 47 du contrôle cut-off fixe l'interprétation de toutes les bandes de protéine dans les IgG et IgM de la façon suivante :

- Intensité inférieure à celle de la bande TpN 47 du contrôle cut-off = 0
- Intensité égale à celle de la bande TpN 47 du contrôle cut-off = 1
- Intensité supérieure à celle de la bande TpN 47 du contrôle cut-off = 2

La somme des intensités des bandes donne l'évaluation globale.

9.3 Signification des antigènes

Liste des protéines recombinées utilisées de l'antigène du *Treponema pallidum* (5, 6).

Désignation de l'antigène	Signification des antigènes	Spécificité des anticorps dans l'LINE
TpN47	Marqueur des syphilis primaires, secondaires et latentes (5, 6)	Hautement spécifique de tous les stades d'infection
TmpA (TpN44,5)		
TpN17		
TpN15		

Nota : La combinaison des antigènes hautement spécifiques répertoriés dans le tableau s'oriente sur les prescriptions des brevets (propriétaire : Krell) n° : DE 195 36 166 C1 et EP 0 855 032 B1 et sur les directives relatives au diagnostic sérologique de la syphilis, MIQ 2001 : Syphilis (Hagedorn) (4).

9.4 Critères d'interprétation

L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les autres résultats d'analyses existants.

Interprétation des IgG	
Somme des intensités des bandes	Interprétation
< 3	Négatif
= 3	Soupçon (*)
> 3	Positif

Interprétation des IgM	
Somme des intensités des bandes	Interprétation
< 2	Négatif
= 2	Soupçon (*)
> 2	Positif

(*) : Si le résultat obtenu indique un soupçon, ordonner le prélèvement et l'analyse d'un deuxième sérum à une date ultérieure ou utiliser une autre procédure de test pour confirmer ou rejeter le soupçon.

9.5 Limites du test

1. Un résultat négatif du transfert n'exclut pas complètement la possibilité d'une infection à *Treponema pallidum*. Il est possible que l'échantillon ait été prélevé avant l'apparition des anticorps ou que la concentration en anticorps soit inférieure à la limite de détection du test.
2. Dans de rares cas, les sérums des patients peuvent afficher des bandes « inversées » (fond sombres, bandes blanches) ; ne pas les interpréter : l'immunoempreinte n'est pas interprétable dans ces cas. Il faudra contrôler le sérum à l'aide d'autres méthodes sérologiques.
3. Il n'est pas possible d'établir un diagnostic concernant la neurosyphilis et la syphilis du nourrisson, car aucun échantillon sérique ou de liquide céphalorachidien correspondant n'était disponible au moment du test.
4. En raison de l'homologie ADN élevée du *T. pallidum* subsp. *pallidum* (syphilis), du *endemicum* (syphilis endémique), du *pertenue* (pian, yaws) et en partie du *Treponema carateum* (caraté), on doit s'attendre à des réactivités croisées. Cela signifie qu'il n'est pas possible d'écarter les tréponématoses non-vénériennes par diagnostic différentiel à l'aide de tests sérologiques (4).
5. Dans des cas isolés, il est possible que l'on obtienne, chez les patients atteints de syphilis latente, des résultats divergents entre les FTA-ABS 19S IgM et les tests par transferts géniques recombinés et même les dosages immuno-enzymatiques. La cause de ces divergences n'a pas encore été élucidée.
6. Lors de l'interprétation d'un petit nombre de résultats IgM positifs ou limites chez les personnes enceintes, il est possible de prendre en compte la présence d'anticorps IgM multiréactifs. Ces résultats doivent être clarifiés au moyen d'autres tests (19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) ou test VDRL).

10. Littérature

1. Lukehart, S.A., and C.M. Marra. 2007. Isolation and Laboratory Maintenance of *Treponema pallidum*. Curr. Protoc. Microbiol. Chapter 12:Unit 12A.1
2. Peeling R.W., and E.W. Hook. 2006. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. J. Pathol. 208(2):224-32.
3. Scotti, A.T., and L. Logan. 1968. A specific IgM antibody test in neonatal congenital syphilis. J. Pediatr. 73:242-243.
4. H.-J. Hagedorn, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, MiQ 2001 (16):1-40
5. Gerber, A., S. Krell, and J. Morenz. 1996-7. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology, Immunobiology. 196(5):535-49
6. Sambri, V., et al. 2001. Western Immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of Syphilis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. (8). 3:534-539
7. Alfen, I., and H.J. Wellensiek. 1994. Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. Lab. Med. (18):12-19

11. Schéma du déroulement du test

Réalisation du test en bref :

Incubation des échantillons	30 minutes	15 µl de sérum/plasma du patient/100 µl de contrôle dans 1,5 ml de tampon de dilution sérique
Lavage	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de lavage et de dilution
Incubation du conjugué	30 minutes	Avec 1,5 ml de conjugué dilué (1 + 100)
Lavage	3 x 5 minutes	Avec 1,5 ml de tampon de lavage et de dilution
	1 x 1 minute	Avec de l'eau distillée/désionisée
Incubation du substrat	10 ± 3 minutes	Avec 1,5 ml de substrat en solution
Arrêt	3 x sans incubation.	Avec 1,5 ml de l'eau distillée/désionisée

Tableau de dilution du conjugué : (valeurs arrondies)

Nbre de bandelettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampon de dilution et de lavage	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Concentré de conjugué	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volume final	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Nbre de bandelettes	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampon de dilution et de lavage	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Concentré de conjugué	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volume final	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Nbre de bandelettes	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampon de dilution et de lavage	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Concentré de conjugué	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volume final	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Nbre de bandelettes	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampon de dilution et de lavage	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Concentré de conjugué	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volume final	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml