

VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot

(T. pallidum IgG LINE-16)

Rendelési szám: WE150G16

(T. pallidum IgG LINE-32)

Rendelési szám: WE150G32

VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot

(T. pallidum IgM LINE-16)

Rendelési szám: WE150M16

(T. pallidum IgM LINE-32)

Rendelési szám: WE150M32

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

VIROTECH Diagnostics GmbH

Löwenplatz 5

D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 13.11.2018

REV 25 / VIROTECH T. pallidum IgG & IgM LINE Immunoblot HU

Tartalom

1. Alkalmazás célja	3
2. A teszt működési elve	3
3. A csomag tartalma.....	3
3.1 Készlet 16 meghatározáshoz.....	3
3.2 Készlet 32 meghatározáshoz.....	3
4. A tesztkit és a reagensek tárolása és eltarthatósága.....	4
5. Óvintézkedések és biztonsági elírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza).....	4
7. Vizsgálati anyag.....	5
8. A vizsgálat elvégzése	5
8.1 A minták előkészítése	5
8.2 A reagensek előkészítése	5
8.3 Az immunoblot vizsgálat elvégzése.....	5
8.4 Immunoblot-processzorok alkalmazása	6
9. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	6
9.1 A betegminták kiértékelése.....	6
9.2 A határérték (cut-off) kontrollok alkalmazása	7
9.3 Az antigének jelentése	7
9.4 Kiértékelési szempontok	7
9.5 A teszt határai	7
10. Irodalom	8
11. A teszt folyamatának vázlata.....	9

1. Alkalmazás célja

Immunoblot csík tesztkészlet *Treponema pallidum*-specifikus IgG- ill. IgM antitestek mennyiségi meghatározására humán szérumból. A tesztkészletet kiterjesztett szifiliszdiagnosztika során kérdéses illetve pozitív első eredmény esetén megerősítő tesztként alkalmazható.

2. A teszt működési elve

A kórokozó-antigén fehérjéit egy speciális porlasztási eljárás segítségével nitrocellulóz membránra viszik fel. A nitrocellulóz membránt ezután csíkokra vágják.

Az antigénhordozó nitrocellulóz csíkok humán szérum- vagy plazmamintákkal való inkubációja lehetővé teszi a jelenlévő specifikus antitestek kimutatását. Ezek az antitestek immunkomplexeket képeznek a tesztcsíkokra rögzített antigénnel. A meg nem kötött antitesteket mosási lépések során eltávolítják, majd a nitrocellulóz-csíkokat alkalikus foszfatázzal konjugált anti-humán IgG illetve IgM antitestekkel inkubálják. Miután a meg nem kötött konjugált antitesteket egy további mosási lépéssel eltávolítják, az antigén-antitest komplexek (a megkötött antitestek) láthatóvá tétele következik egy szintelen szubsztrát hozzáadásával, mely enzimatisz átalakítás után ibolyakék színű csíkokat (antigén sávokat) eredményez. Az enzim-szubsztrát reakciót a nitrocellulóz-csíkok desztillált vagy ioncserélt vízben történő mosásával állítják le. A megjelenő csíkok mintázata alapján következtethetünk specifikus IgG illetve IgM antitestek jelenlétére.

3. A csomag tartalma

3.1 Készlet 16 meghatározáshoz

- | | | |
|---|-----------|---------|
| 1. IgG- ill. IgM Nitrocellulóz csíkok porlasztással felvitt antigénnel, fóliával megerősítve, füzetekbe kötve, felhasználásra kész | 1x | 16 csík |
| 2. IgG ill. IgM határérték (cut-off) kontroll, humán szérum, elhígított | 1x | 1,0 ml |
| 3. Hígító- /mosópuffer , pH 7,3 (10x konc.), Tris pufferben, tartósítószerrel | 1x | 50 ml |
| 4. IgG- ill. IgM-konjugátum (100x konc.)
Anti-humán, (kecske) alkalikus foszfatáz, tartósítószerrel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Szubsztrát (BCIP/NBT), felhasználásra kész | 1x | 57 ml |
| 6. Kiértékelési protokoll az eredmények jegyzékönyvezéséhez és archiválásához | 1x | 1 db |

3.2 Készlet 32 meghatározáshoz

- | | | |
|---|-----------|---------|
| 1. IgG- ill. IgM Nitrocellulóz csíkok porlasztással felvitt antigénnel, fóliával megerősítve, füzetekbe kötve, felhasználásra kész | 2x | 16 csík |
| 2. IgG ill. IgM határérték (cut-off) kontroll, humán szérum, elhígított | 1x | 1,0 ml |
| 3. Hígító- /mosópuffer , pH 7,3 (10x konc.), Tris pufferben, tartósítószerrel | 2x | 50 ml |
| 4. IgG- ill. IgM-konjugátum (100x konc.)
Anti-humán, (kecske) alkalikus foszfatáz, tartósítószerrel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Szubsztrát (BCIP/NBT), felhasználásra kész | 1x | 57 ml |
| 6. Kiértékelési protokoll az eredmények jegyzékönyvezéséhez és archiválásához | 1x | 1 db |

Kérésre külön kapható:

IgG ill. IgM- Pozitív kontroll, humán szérum, elhígított, 0,5 ml.

A pozitív sávok > határérték (cut-off) sávok a mellékelt tanúsítványban találhatóak
(Rendelési szám: IgG: WE150P60 ill. IgM: WE150P80)

IgG/IgM- Negatív kontroll, humán szérum, elhígított, 0,5 ml.

A negatív kontrollon nem láthatóak sávok, ill. nem láthatóak a releváns sávok és > határérték (cut-off) sávok kiértékeléséhez szükséges sávok.

(Rendelési szám: IgG/IgM: WE150N10)

4. A tesztkit és a reagensek tárolása és eltarthatósága

A tesztkitet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzési tanúsítványt.

1. Az egyes reagenseket nem szabad lefagyasztani illetve magas hőmérsékletnek kitenni.
2. A reagenseket a lejáratí időn túl nem szabad felhasználni.
3. Kerülje a reagensek erősen fényben történő tárolását.
4. A BCIP / NBT szubsztrátoldat fényérzékeny, ezért sötétben kell tárolni.
5. **Nitrocellulóz tesztcsíkok:** A tasakból kivett tesztcsíkokat azonnal fel kell használni. A fel nem használt csíkokat tartalmazó tasakot azonnal vissza kell zárni és 2-8°C között kell tárolni. Az eredmények archiválásához (a csíkok kifakulásának megakadályozására) a nitrocellulóz tesztcsíkokat feltétlenül védeni kell a közvetlen napfénytől.

Anyag	Állapot	Tárolás	Stabilitás
Vizsgálati minták	hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Tesztcsíkok	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban)	3 hónap
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	hígított	+2 és +8°C között	kb. 6 óra
Szubsztrátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
	végghígított (használatra kész)	+2 és +8°C között	4 hét
	végghígított (használatra kész)	vagy szobahőmérséklet	2 hét

5. Óvintézkedések és biztonsági előírások

1. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és nitrocellulóz tesztcsík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő és ennek megfelelő óvatossággal kezelendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
2. Az immunoblot kivitelezése során viseljen eldobható kesztyűt és használjon műanyag csipeszt.
3. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.
4. Az inkubációs kádakat a gyártó csak egyszeri használatra fejlesztette ki. Az inkubációs kádak többszöri használata a felhasználó felelőssége. Ha a többszöri használat mellett dönt, javasoljuk, hogy az inkubációs kádakat használat után fertőtlenítsen több órán keresztül 1% nátrium-hipoklorit oldatban, mosogassa el és alaposan öblítse el csapvízzel majd desztillált vagy ioncserélt vízzel.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Inkubációs kanna (igény esetén megrendelhető a WE300 rendelési számon)
2. Rázógép (vertikális, nem körkörös)
3. Spriccfleska a reakció leállításához
4. Pipetta vagy kézi mosó készülék
5. Mikropipetták: 5 µl és 1500 µl
6. Pipettahegyek
7. Mintaedények (csövek) 2-20 ml térfogattal
8. Műanyag csipesz
9. Desztillált vagy ioncserélt víz
10. Filterpapír

7. Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

8. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által elírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

8.1 A minták előkészítése

1. Páciensmintánként 15 µl szérum vagy plazma szükséges.
2. A vérmintákat aseptikusan, a véna megszurásával kell levenni. Teljes alvadás után le kell választani a szérumot (plazmánál kiesik). Hosszabb tároláshoz a szérumokat -20°C-ra le kell fagyasztani.
3. A többszöri felolvasztást kerülni kell.
4. Híjaktívált, hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat nem szabad felhasználni, mivel hamis eredményekhez vezethetnek.
5. Zavaros szérummintákat (különösen felolvasztás után) nem szabad felhasználni. Centrifugálás (5 perc, 1000 g) után a tiszta felülúszót lepipettázva, azt használja fel a testben.

8.2 A reagensek előkészítése

1. A laboratóriumi rutinmunkát segítő az összes LINE és EcoBlot egyetlen tesztfutamban, azonos inkubációs idővel, különböző paraméter- és különböző gyártási tételbe tartozó komponensekkel feldolgozható. Az alkalmazandó határérték (cut-off) kontrollok paraméter- és szarsspecifikusak.
2. Hígítás előtt engedjen minden reagenst felmelegedni szobahőmérsékletre. Csak a legjobb minőségű, szobahőmérsékletű desztillált vagy ioncserélt vizet használjon.
3. A kihígított munkaoldatokat alkalmazás előtt alaposan keverje fel.
4. **Hígító- /mosópuffer**
A hígító- /mosóoldat 10-szörös töménységben kerül kiszerezésre. A hígító- /mosóoldatot 01:10:00 arányban hígítsa desztillált vagy ioncserélt vízzel (10ml/50ml/100ml koncentráció + 90ml/450ml/900ml deszt./ioncserélt víz) és alaposan keverje meg.
A hígító-/mosófolyadék, mind tömény, mind hígított állapotban sárga elszíneződést mutathat. Ez a sárga elszíneződés sem a hígító-/mosófolyadék eltarthatóságát, sem a teszt eljárás működését és diagnosztikai megbízhatóságát nem befolyásolja.
5. **IgG- ill. IgM-konjugátum:**
A konjugátumot hígítsa fel 1:100 arányban (megfelelően kihígított) hígító- /mosópufferben és jól keverje meg. Szérum mintánként 1,5 ml konjugátum munkaoldat szükséges. Ld. konjugációs hígítási táblázat (12. pont: A teszt folyamatának vázlata).
6. **Szubsztrátoldat**
A szubsztrátoldatot felhasználásra kész állapotban csomagoljuk és szállítjuk.

8.3 Az immunoblot vizsgálat elvégzése

Vigyázat: A nitrocellulóz tesztcsíkokat csak a megadott Ig osztályban szabad alkalmazni (ld. a blotfüzetek címkéjét és az egyes tesztcsíkok jelölését).

A *Treponema pallidum* LINE teszt korrekt végrehajtása és kiértékelése érdekében minden teszt során egy paraméter- és szarsspecifikus határérték (cut-off) kontroll tesztet is el kell végezni.

Az *Treponema pallidum* biztonságos diagnosztizálásához az LINE tesztet az IgG és IgM osztályban is ajánlott elvégezni.

1. A tesztet szobahőmérsékleten kell végezni.
2. Minden mintához helyezzen egy csíkot egy tiszta inkubációs kád barázdájába. A csíkokat lehetőség szerint csak a megjelölt felső végükön érintse.

3. Pipettázzon 1,5 ml felhasználásra kész **hígító- /mosópuffer** minden tesztcsíkra és helyezze az inkubációs kannát a rázógépre. Ügyeljen rá, hogy a folyadék egyenletesen fedje be a nitrocellulóz tesztcsíkokat; a csíkoknak a teszt során végig nem szabad kiszáradniuk.
4. A megerősített nitrocellulóz csíkok egy perc alatt teljesen átnedvesednek és tetszés szerint inkubálhatóak a hátukra, oldalukra vagy elülső felükre fektetve.
5. Egyenként **15 µl páciensszérumot/-plazmát**, illetve **100 µl határérték / pozitív / negatív kontrollt** kell hozzápipettázni, lehetőleg a csík felső megjelölt végére. Inkubálja **30 percig** a betegszérumot és kontrollokat a rázógépben. Pipetázás és a folyadékok leöntése során ügyeljen arra, hogy az egyes betegmintáknál ne fordulhasson elő keresztkontamináció.
6. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy óvatosan öntse le. A folyadék leöntésekor a nitrocellulóz csíkok a barázdák aljához tapadva maradnak. A maradék folyadékot csepegtesse ki egy papírtörülközőre.
7. A csíkok **mosása**: inkubálja a csíkokat a rázógépben, csíkonként 1,5ml felhasználásra kész hígító- /mosópufferben, **3 x 5 percig**. A mosópuffert mindig szívja le vagy öntse le teljes egészében. Az utolsó mosási lépés befejezése előtt készítse el (hígítsa ki) a szükséges mennyiségű konjugátum munkaidőoldatot (ld. táblázat).
8. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy óvatosan öntse le (ld. 6. pont).
9. Csíkonként pipettázzon 1,5 ml-t az előzőek szerint elkészített **konjugátum munkaidőoldatból** a megfelelő inkubációs barázdákba és inkubálja a csíkokat **30 percig** a rázógépben.
10. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy öntse le.
11. A csíkok **mosása**: inkubálja a csíkokat a rázógépben, csíkonként 1,5ml felhasználásra kész hígító- /mosópufferben **3 x 5 percig**. A mosópuffert mindig szívja le vagy öntse le teljes egészében. Végül öblítse le a csíkokat **1 x 1 percig** desztillált vagy ioncserélt vízben.
12. A barázdákból a folyadék teljes mennyiségét szívja ki vagy óvatosan öntse le (ld. 6. pont).
13. Csíkonként pipettázzon 1,5 ml-t **szubsztrátoldatból** a barázdákba és hívja elő a csíkokat **10 ± 3 percig** a rázógépben.
14. Az előhívást (a szín megjelenését) a szubsztrátoldat leöntésével **állítsa le**. Végül mossa le a csíkokat **3 x 1,5 ml desztillált vagy ioncserélt vízzel** (inkubáció nélkül).
15. Öntse le a desztillált vagy ioncserélt vizet és szárítsa meg a csíkokat egy tiszta papírtörülközőn. A nedves nitrocellulóz tesztcsíkokon megfigyelhető háttér-elszíneződés a csíkok megszáritásával teljesen eltűnik. A megerősített nitrocellulóz tesztcsíkok a közönséges nitrocellulóz tesztcsíkokhoz viszonyítva valamivel hosszabb időt igényelnek a száradáshoz.
16. A kiértékeléshez használja a mellékelt kiértékelési protokollt. A specifikus sávok feliratozása a protokoll-lapon és közvetlenül a nitrocellulóz filteren megkönnyíti a betegminták kiértékelését.

A teszt folyamatának vázlatát ld. az utolsó oldalon

8.4 Immunoblot-processzorok alkalmazása

A blotok és LINE-ok automatikus feldolgozására az alábbi eszközök vannak jóváhagyva: Apollo és Profiblot. Alapjában véve minden kereskedelembe kapható blotautomata alkalmas.

9. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A biztos kiértékeléshez minden LINE csík két kontrollal van ellátva:

1. **Szérum kontroll** (= serum control):
Csak a betegszérummal való inkubáció után jelenik meg a jelölési vonal (=markline) alatt a széruminkubációs sáv.
2. **Konjugációs kontroll** (= conjugate control):
Az LINE csíkon egy konjugációs kontroll sáv található, mely a megfelelő konjugátummal való inkubálás hatására jelenik meg.

A végrehajtott teszt akkor érvényes, ha az előhívott nitrocellulóz tesztcsíkon mind a szérumkontroll, mind a belső konjugációs kontroll sáv egyértelműen látható.

A szérum- és konjugációs sávok pozícióját a protokoll-lapon találja.

9.1 A betegminták kiértékelése

A reagáló sávok pozícióját és leírását a jegyzőkönyv lapon találja.

IgG és IgM-sávok: TpN47, TpmA, TpN17, TpN15, BMP

9.2 A határérték (cut-off) kontrollok alkalmazása

A határérték (cut-off) sávok (TpN 47) intenzitásánál gyengébb sávokat a kiértékelés során nem szabad figyelembe venni. A TpN47 sávnak gyenge intenzitású jelet kell adnia.

A sávok intenzitásának megítélése:

TpN 47 sáv: A határérték (cut-off) kontroll TpN 47 sáv intenzitása valamennyi proteinsáv IgG és IgM osztálybeli értékelését meghatározza az alábbiak szerint:

- Gyengébb intenzitás, mint a határérték (cut-off) kontroll TpN 47 sáv = 0
- A határérték (cut-off) kontroll TpN 47 sávval azonos intenzitás = 1
- Erősebb intenzitás, mint a határérték (cut-off) kontroll TpN 47 sáv = 2

A sávintenzitások összege (a BMP sáv nélkül) adja az összesített értékelést.

9.3 Az antigének jelentése

A felhasznált rekombináns *Treponema pallidum* antigén-fehérjék felsorolása (5, 6).

Antigén / leírás	Az antigének jelentése	Az antitestek specifitása az LINE tesztben
TpN47	Primer, szekunder vagy látens szifilisz markere (5, 6)	Különösen specifikus minden fertőzési stádiumban
TpA		
TpN17		
TpN15		
BMP	Ez a sáv nem játszik szerepet az LINE teszt kiértékelésében. (**)	Kevésbé specifikus

Utalás: A táblázatban felsorolt nagyspecifitású antigének kombinációja a DE 195 36 166 C1 és EP 0 855 032 B1 szabadalmakon (szabadalom tulajdonos S. Krell) és a szerológiai szifiliszdiagnostika (MIQ 2001: Szifilisz (Hagedorn) (4) irányelvein alapul.

9.4 Kiértékelési szempontok

A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.

Utasítás a BMP sávhoz ():** A BMP sáv az összesített értékelésben nem szerepel, mivel ezzel a fehérjével kapcsolatban nem áll rendelkezésre kellő tapasztalat. Nem alkalmazható korai markerként. Mindazonáltal bizonyos eredmények arra utalnak, hogy a BMP elleni antitestkoncentráció eredményes terápia esetén (a többi fehérjék ellen képzett antitestekhez viszonyítva) korábban kezd csökkenni. Ezen kívül úgy tűnik, hogy rekurrens fertőzés esetén ismét megjelenik, illetve mennyisége megemelkedik.

IgG-értékelés:	
A sávintenzitások összege	Interpretáció
< 3	negatív
= 3	kétes (*)
> 3	pozitív

IgM-értékelés:	
A sávintenzitások összege	Interpretáció
< 2	negatív
= 2	kétes (*)
> 2	pozitív

(*): kétes lelet esetén második szérumot kell venni a teszt megismétléséhez vagy egy másik teszt módszerhez kell folyamodni.

9.5 A teszt határai

1. Negatív immunoblot eredmény nem zárja ki teljes egészében a *Treponema*-fertőzés lehetőségét. Lehetőség, hogy a mintát az antitestek megjelenése előtt vették, illetve, hogy az antitesttiter a teszt kimutatási határértéke alatt van.

2. Ritka esetekben a betegszérumok "negatív sávokat mutathatnak (sötét háttér, fehér sávok); ezeket a tesztek nem szabad figyelembe venni, az immunoblot ezekben az esetekben nem értékelhető. A szérumot más szerológiai módszerekkel kell ellenőrizni.
3. Neuroszifiliszre illetve újszülött szifiliszre vonatkozó diagnosztikai kijelentés a teszt alapján nem tehető, mivel megfelelő szérum- ill. liquorminták hiányában teszt ilyen irányú kiértékelése nem történhetett meg.
4. A *T. pallidum subsp. pallidum* (szifilisz), *endemicum* (endemikus szifilisz) és *pertenue* (framboesia), illetve bizonyos fokig a *Treponema carateum* (pinta) között fennálló nagyfokú DNS-homológia miatt keresztreaktivásra lehet számítani. Ennek értelmében szerológia tesztek alkalmazása során a nem venerikus treponematosos differenciáldiagnosztikai kizárása nem lehetséges (4).
5. Lues latens beteg esetében egyedi esetekben ellentmondásos lehet a 19S-IgM-FTA-ABS és a rekombináns blot-teszt illetve az enzim immunoassay eredmények között. Ezeknek az ellentmondásos eredményeknek az oka egyelőre ismeretlen.
6. Izolált határértékű, illetve terhes nőknél pozitív IgM-eredmény interpretációja esetén figyelembe kell venni a multireaktív IgM-antitestek létezésének lehetőségét. Ezeket az eredményeket további tesztekkel (19S-IgM-FTA-ABS (IgM-ELISA) vagy VDRL-teszt) kell vizsgálni.

10. Irodalom

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. A teszt folyamatának vázlata

A teszt kivitelezésének rövid leírása:

Mintainkubáció	30 perc	15 µl páciensszérum/-plazma / 100 µl kontroll tesztenként 1,5 ml hígító- /mosópufferrel
Mosás	3 x 5 perc	Tesztenként 1,5 ml hígító- /mosópufferrel
Konjugátum inkubáció	30 perc	1,5 ml munkaoldattal (1:100 hígított)
Mosás	3 x 5 perc 1 x 1 perc	Tesztenként 1,5 ml hígító- /mosópufferrel Desztillált / ioncserélt vízzel
Szubsztrátinkubáció	10 ± 3 perc	Tesztenként 1,5 ml szubsztrátoldattal
Leállítás	3 x, köztes inkubáció nélkül	Tesztenként 1,5 ml desztillált / ioncserélt vízzel

Táblázat: konjugátum munkaoldat hígítása (kerekítve)

Csíkok száma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hígító- /mosópuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugátum koncentrátum	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Végső térfogat	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Csíkok száma	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Hígító- /mosópuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugátum koncentrátum	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Végső térfogat	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Csíkok száma	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Hígító- /mosópuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugátum koncentrátum	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Végső térfogat	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Csíkok száma	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Hígító- /mosópuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugátum koncentrátum	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Végső térfogat	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml