

**VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot**  
**(Borrelia in vivo IgG LINE-32; Borrelia in vivo IgG LINE-96)**

N° articolo: WE222G32; WE222G96

**VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot**  
**(Borrelia in vivo IgM LINE-32; Borrelia in vivo IgM LINE-96)**

N° articolo: WE222M32; WE222M96

**VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot**  
**(Borrelia in vivo + Tpn17 IgG LINE-32; Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-96)**

N° articolo: WE223G32; WE223G96

SOLO PER LA DIAGNOSTICA IN VITRO



**Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH**

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germania

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: [info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com](mailto:info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com)

Sito Web: [clinical.goldstandarddiagnostics.com](http://clinical.goldstandarddiagnostics.com)



# Indice

<b>1. Finalità d'uso</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Principio del test</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Contenuto della confezione</b> .....	<b>3</b>
3.1 Kit per 32 determinazioni .....	3
3.2 Kit per 96 determinazioni .....	3
<b>4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi</b> .....	<b>4</b>
<b>5. Precauzioni e avvertenze</b> .....	<b>4</b>
<b>6. Altro materiale occorrente (non fornito)</b> .....	<b>4</b>
<b>7. Materiale di analisi</b> .....	<b>5</b>
<b>8. Esecuzione del test</b> .....	<b>5</b>
8.1 Preparazione dei campioni.....	5
8.2 Preparazione dei reattivi .....	5
8.3 Esecuzione del test di Immunoblot .....	5
8.4 Impiego di processori Immunoblot .....	6
<b>9. Valutazione del test</b> .....	<b>6</b>
9.1 Valutazione dei campioni .....	7
9.2 Impiego del controllo cut off .....	7
9.3 Significato dell'antigene .....	7
9.4 Criteri di valutazione.....	9
9.5 Limiti del test .....	11
<b>10. Bibliografia</b> .....	<b>11</b>
<b>11. Simboli</b> .....	<b>13</b>
<b>12. Schema di svolgimento del test</b> .....	<b>14</b>

## 1. Finalità d'uso

---

Kit LINE Immunoblot per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG e/o IgM specifici della *B. burgdorferi* sensu lato nel siero umano.

Oltre all'impiego nella sierodiagnosi della borreliosi di Lyme, l'immunoblot IgG Line risulta idoneo per l'impiego nella diagnostica del liquido cerebrospinale per la neuroborreliosi. Per l'impiego nella diagnostica del liquido cerebrospinale si prega di richiedere le istruzioni per l'uso separate.

## 2. Principio del test

---

Gli antigeni dell'agente patogeno vengono trasferiti su una membrana di nitrocellulosa mediante una speciale tecnica a spruzzo. Tale membrana viene in seguito tagliata in singole strisce.

L'incubazione delle strisce di nitrocellulosa che supportano l'antigene assieme ai campioni di siero/plasma umano consente di individuare la presenza di anticorpi specifici. Tali anticorpi formano immunocomplessi con l'antigene fissato sulle strisce di prova. Dopo avere rimosso gli anticorpi non legati mediante opportune fasi di lavaggio, le singole strisce di nitrocellulosa vengono incubate con anticorpi IgG e/o IgM anti-umani coniugati a fosfatasi alcalina. Mediante un'ulteriore fase di lavaggio si rimuovono poi gli anticorpi coniugati non legati e si esegue la visualizzazione del complesso antigene/anticorpi (gli anticorpi legati), aggiungendo un substrato non colorato il quale, per reazione enzimatica propria, genera bande di colore violetto ("bande dell'antigene"). La reazione enzima/substrato viene arrestata lavando le strisce di nitrocellulosa in acqua distillata/deionizzata. A seconda del pattern delle bande osservato, si può rilevare la presenza di anticorpi specifici IgG e/o IgM.

## 3. Contenuto della confezione

---

### 3.1 Kit per 32 determinazioni

1. <b>IgM o IgG Strisce di prova di nitrocellulosa</b> con antigeni supportati, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso	<b>1x</b>	32 strisce
2. <b>Controllo cut off IgM o IgG</b> , siero umano, prediluito	<b>1x</b>	1,0 ml
3. <b>Tampone di lavaggio e di diluizione</b> , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris	<b>2x</b>	50 ml
4. <b>Coniugato IgG o IgM</b> (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante	<b>1x</b>	0,7 ml
5. <b>Substrato</b> (BCIP/NBT), pronto per l'uso	<b>1x</b>	57 ml
6. <b>Scheda protocollo d'analisi</b> per protocollare e archiviare i risultati	<b>1x</b>	1 pz.

### 3.2 Kit per 96 determinazioni

1. <b>IgM o IgG Strisce di prova di nitrocellulosa con antigeni supportati, rinforzate</b> con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso	<b>3x</b>	32 strisce
2. <b>Controllo cut off IgM o IgG</b> , siero umano, prediluito	<b>2x</b>	1,0 ml
3. <b>Tampone di lavaggio e di diluizione</b> , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris	<b>4x</b>	50 ml
4. <b>Coniugato IgG o IgM</b> (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante	<b>3x</b>	0,7 ml
5. <b>Substrato</b> (BCIP/NBT), pronto per l'uso	<b>3x</b>	57 ml
6. <b>Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati</b>	<b>3x</b>	1 pz.

### Su richiesta sono disponibili anche:

IgG o IgM- Controllo positivo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Per le bande positive  $\geq$  banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE222P60 / WE223P60 o IgM: WE222P80)

IgG/IgM- Controllo negativo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Il controllo negativo non presenta nessuna banda, né bande rilevanti per la valutazione  $\geq$  banda cut off.

(Art. n°: IgG/IgM: WE222N10 o WE223N60)

#### 4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Non esporre i singoli reattivi a temperature eccessivamente basse o elevate.
2. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza.
3. Non conservare i reattivi in ambiente con luce abbagliante.
4. La soluzione per substrato BCIP/ NBT è fotosensibile e va conservata al buio.
5. **Strisce di reazione in nitrocellulosa:** utilizzare immediatamente le strisce dopo averle estratte dalla scatola. Chiudere perfettamente le scatole contenenti strisce non utilizzate e conservare a 2-8°C. Per l'archiviazione dei risultati, si raccomanda di proteggere le strisce di reazione in nitrocellulosa dalla luce diretta del sole, in modo da evitare lo scolorimento delle bande.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Strisce di reazione	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (conservazione nella busta in dotazione)	3 mesi
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	circa 6 ore
Substrato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +8°C	4 settimane
	diluizione finale (pronta per l'uso)	<i>oppure</i> temperatura ambiente	2 settimane

#### 5. Precauzioni e avvertenze

1. Come sieri di controllo si impiegano esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV ed agli antigeni di superficie dell'epatite B. Tuttavia i sieri di controllo, i campioni, i campioni diluiti, i coniugati e le strisce di reazione in nitrocellulosa devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. Durante l'esecuzione dell'immunoblot indossare guanti monouso e utilizzare pinzette di plastica.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.
4. Le vasche di incubazione sono state concepite dal produttore come prodotti monouso. L'uso ripetuto di tali vasche ricade sotto la responsabilità dell'utilizzatore. In caso di uso ripetuto, raccomandiamo di disinfettare le vasche di incubazione per parecchie ore utilizzando soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, pulendo e risciacquando a fondo con acqua corrente e acqua distillata/deionizzata.

#### 6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Vasca di incubazione (se necessario disponibile come art. n° WE300.08)
2. Agitatore (verticale non centrifugo)
3. Un flacone spruzzatore per bloccare la reazione
4. Pipetta o lavatore manuale
5. Micropipette da 5 µl - 1500 µl
6. Puntali pipettatori
7. Tubetti per campioni, volumi 2-20 ml
8. Pinzetta di plastica
9. Acqua distillata o deionizzata
10. Carta filtrante

## 7. Materiale di analisi

---

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero. Per l'impiego di liquor, consultare le istruzioni per l'uso separate del test Liquor LINE.

## 8. Esecuzione del test

---

Il rigoroso rispetto delle istruzioni di lavoro è la premessa indispensabile per conseguire risultati corretti.

### 8.1 Preparazione dei campioni

1. Per ogni campione prelevato dai pazienti sono necessari 15 µl di siero o di plasma. Nell'elaborazione di liquor/siero, utilizzare soltanto la diluizione di liquor/siero separata, calcolata singolarmente, per ogni classe di Ig (v. Istruzioni per il test Liquor LINE).
2. Si raccomanda di eseguire il prelievo venoso in condizioni asettiche. Separare il siero quando la coagulazione è completa (non presente per il plasma). Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato a - 20°C.
3. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente i sieri.
4. I sieri inattivati al calore, lipemici, emolitici o contaminati da batteri possono dare origine a risultati falsati e se ne sconsiglia pertanto il riutilizzo.
5. Non impiegare campioni di siero torbidi (specialmente dopo scongelamento), eventualmente centrifugarli (5 min. a 1000x g), quindi utilizzare per il test il surnatante limpido.

### 8.2 Preparazione dei reattivi

1. Per l'adattamento alla routine di laboratorio, è possibile elaborare tutti i LINE e gli EcoBlot in un unico ciclo di prova con gli stessi tempi di incubazione e componenti con una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli cut off saranno predisposti in modo specifico ai parametri e ai lotti.
2. Prima di diluire i reattivi di prova, portare i concentrati a temperatura ambiente. Utilizzare esclusivamente acqua distillata/deionizzata di alta qualità e a temperatura ambiente.
3. Mescolare accuratamente le diluizioni prima di eseguire il test.
4. **Tampone di diluizione / lavaggio**  
Il tampone di lavaggio e di diluizione è concentrato 10 volte. Diluire il concentrato del tampone di lavaggio e di diluizione 1:10 con acqua distillata o deionizzata (concentrato 10ml/50ml/100ml + 90ml/450ml/900ml acqua dist./deionizzata) e miscelare bene.  
Sia i tamponi di diluizione/di lavaggio concentrati che quelli diluiti possono a volte presentare una colorazione giallastra. Tale fenomeno non ha alcun effetto né sulla durata del tampone, né sulla funzionalità e sull'attendibilità diagnostica della serie di test.
5. **Coniugato IgG e/o IgM**  
Diluire il coniugato 1 + 100 con tampone di diluizione/lavaggio a diluizione finale, mescolare accuratamente. Per ciascun campione di siero si richiedono 1,5 ml di soluzione d'uso di coniugato. Vedere la tabella di diluizione del coniugato (punto: "Schema del test").
6. **Soluzione per substrato**  
La soluzione per substrato viene fornita pronta per l'uso.

### 8.3 Esecuzione del test di Immunoblot

**Attenzione:** Le strisce di nitrocellulosa possono essere testate esclusivamente nella classe Ig idonea (vedere l'etichetta sulla bustina del blot e la descrizione su ciascuna singola striscia di prova).

Per l'esecuzione e la valutazione corrette degli *Borrelia* in vivo LINE, utilizzare anche un controllo cut off per ogni serie di test.

**Al fine di formulare una diagnosi certa di *Borrelia*, si raccomanda di eseguire il test LINE nelle IgG e IgM.**

1. Il test va eseguito a temperatura ambiente.
2. Inserire 1 striscia per ciascun campione nell'apposita scanalatura di una vasca d'incubazione pulita. Se possibile, afferrare le strisce solo dall'estremità superiore contrassegnata.
3. Dispensare su ciascuna striscia 1,5ml di **tampone di diluizione / lavaggio** pronto per l'uso e inserire nell'agitatore. Fare attenzione che le strisce di prova in nitrocellulosa siano coperte dal liquido in modo uniforme e che non si asciughino per l'intera durata di esecuzione del test.
4. Le strisce di prova rinforzate in nitrocellulosa vanno inumidite completamente entro un minuto e possono essere incubate in posizione rovesciata verso l'alto, capovolta o di lato.
5. Aggiungere su ogni striscia **15 µl di siero/plasma del paziente o 100 µl del controllo cut off / positivo / negativo**, se possibile sull'estremità superiore contrassegnata. Incubare il siero del paziente e il controllo per **30 minuti** sull'agitatore. Durante la dispensazione e il successivo versamento, fare attenzione a evitare contaminazioni crociate tra i singoli campioni.
6. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare scolare con precauzione. Mentre si fa defluire il liquido, le strisce di prova in nitrocellulosa rimangono attaccate al bordo delle scanalature. Asciugare con carta assorbente il liquido residuo.
7. **Lavaggio** delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per **3 x 5 minuti** sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Prima di procedere con l'ultima fase di lavaggio, preparare la necessaria quantità di diluizione fresca di coniugato (v. tabella).
7. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
8. Dispensare 1,5 ml della **diluizione di coniugato** preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per **30 minuti** sull'agitatore.
9. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
10. **Lavaggio** delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per **3 x 5 minuti** sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Successivamente sciacquare per **1 x 1 minuti** con **acqua distillata/deionizzata**.
11. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
12. Dispensare 1,5 ml di **soluzione per substrato** pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per **10 ± 3 minuti**.
13. **Arrestare** lo sviluppo cromatico facendo defluire la soluzione per substrato. Successivamente sciacquare le strisce per **3 volte** senza incubazione intermedia, utilizzando 1,5 ml di **acqua distillata/deionizzata** per ciascuna.
14. Fare scolare l'acqua distillata/deionizzata e lasciare asciugare le strisce su un carta assorbente pulita. La colorazione di fondo, osservabile sulle strisce di prova in nitrocellulosa umide, scompare completamente sulle strisce asciutte. Rispetto alle strisce di prova in nitrocellulosa tradizionali, quelle rinforzate richiedono un tempo leggermente più lungo per asciugarsi.
15. Per la valutazione, utilizzare il relativo protocollo allegato. La dicitura delle bande altamente specifiche riportata sulla scheda di protocollo facilita la valutazione dei campioni dei pazienti.

**Vedere lo schema del test sull'ultima pagina**

#### 8.4 Impiego di processori Immunoblot

Per l'elaborazione automatica dei Blot e dei LINE, sono stati convalidati i seguenti apparecchi: Apollo e Profiblot. In linea di principio, sono idonei tutti i dispositivi automatici per Blot disponibili in commercio.

#### 9. Valutazione del test

Per una valutazione sicura, ciascuna striscia LINE è provvista di due controlli:

1. **Controllo del siero** (= serum control):  
La banda di incubazione del siero compare sotto la linea di marcatura (= markline) soltanto dopo l'incubazione con il siero del paziente.
2. **Controllo coniugato** (= conjugate control):  
La strip LINE è dotata di una banda di controllo del coniugato che compare dopo l'incubazione con il coniugato corrispondente.

L'esecuzione del test è valida se sulle strisce di prova in nitrocellulosa sviluppate è chiaramente riconoscibile non solo il controllo del siero ma anche il controllo del coniugato interno.

Per la posizione della banda del controllo del siero/coniugato si rimanda alla scheda di protocollo.

### 9.1 Valutazione dei campioni

Per la posizione e la descrizione delle bande reattive si rimanda alla scheda di protocollo.

Bande delle IgM: OspC, VlsE-Mix, p39 e una banda per la diagnosi di esclusione

Bande delle IgG: VlsE-Mix, p39, p83/100, (iv1), (iv2), (iv3), (iv4) e banda TpN17 per la diagnosi di esclusione (solo per WE 223G)

### 9.2 Impiego del controllo cut off

Le bande di intensità inferiore alla banda cut off del controllo cut off non vengono incluse nella valutazione.

Banda cut off delle IgM: OspC

Banda cut off delle IgG: VlsE-Mix

### 9.3 Significato dell'antigene

Elenco degli antigeni utilizzati purificati (OspC) e ricombinanti (VlsE, p83/100, p39, BBA36, BBO323, Crasp3 e pG) anti *Borrelia burgdorferi*, del **Viral Capsid Antigen** (antigene virocapsidico) anti EBV gp125 e degli antigeni TpN17.. La miscela VlsE è costituita da due antigeni ricombinanti delle genospecie *Borrelia burgdorferi* s. s. e *Borrelia garinii*.

Antigene/ Denominazione	Significato dell'antigene	Specificità degli anticorpi nel LINE	Ceppi originali/purificazioni
<b>OspC (p23), antigene nativo purificato</b>	<b>Outer surface-protein C.</b> Lipoproteina codificata da plasmide (6, 22, 26, 28). Importante marker per manifestazioni precoci della borreliosi di Lyme nella sierologia delle IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). <u>Significato biologico:</u> <i>B. burgdorferi</i> s. l. richiede presumibilmente la OspC per la trasmissione di un'infezione iniziale al mammifero ospite (46, 47, 48, 49). Le spirochete esprimono l'OspC durante il pasto ematico nella zecca e nella fase iniziale dell'infezione nel mammifero ospite (46). Dopo la trasmissione delle spirochete al mammifero, si verifica di nuovo una sotto-regolazione dell'espressione dell'OspC. La lipoproteina non sembra essere necessaria per un'infezione persistente (47, 47). Tilly et al. ipotizzano che la OspC prevenga la fagocitosi delle spirochete durante la fase iniziale dell'infezione del mammifero ospite (50).	Specifico (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (originariamente isolato in Germania da lesione da eritema migrante umano) / purificato tramite SDS-Page preparatorio
<b>VlsE, ricombinante</b>	<b>Variable major protein like sequence E.</b> Lipoproteina di <i>B. burgdorferi</i> espressa <i>in vivo</i> , che presenta epitopi conservati – intragenospecie – altamente immunogeni. Nella sierologia delle IgM si osservano reattività nei confronti di VlsE in particolare in sieri di pazienti con borreliosi di Lyme in stadio precoce. Nella sierologia delle IgG si osservano reattività nei confronti di VlsE in sieri di pazienti con borreliosi di Lyme in stadio precoce e avanzato. Nella sierologia delle IgG, VlsE funge da marker della borreliosi di Lyme esteso a tutti gli stadi della malattia. VlsE è un antigene di peso molecolare di 35 kDa, codificato su lp28-1 (2). <u>Significato biologico:</u> <i>B. burgdorferi</i> s.l. può persistere in mammiferi infetti malgrado attivazione della loro risposta immunitaria. Si suppone che a tale persistenza contribuisca la variazione combinatoria degli antigeni della proteina di superficie VlsE – come meccanismo "immune escape" (51, 52, 53).	Specifico	<i>B. burgdorferi</i> B31 (originariamente isolato a Shelter Island, N. Y., da una zecca infetta), <i>B. garinii</i> IP90 (originariamente isolato in Russia da una zecca infetta) /  Purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA

<b>p39 (BmpA), ricombinante</b>	<b>Borrelial membrane protein A.</b> Marker centrale codificato da cromosoma (6, 19) nella sierologia delle IgG per infezioni disseminate da borreliosi di Lyme (4, 8, 18). Le proteine Bmp sono lipoproteine con funzione ancora sconosciuta.	Altamente specifico (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (originariamente isolato in Germania da lesione da eritema migrante umano) / purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA
<b>p83/100, ricombinante</b>	Antigene codificato da cromosoma, associato a cilindro protoplasmatico (12, 13), conservato nella <i>B. burgdorferi</i> s. l. (17). Marker centrale nella sierologia delle IgG per borreliosi di Lyme in stadio avanzato (8, 24, 29).	Altamente specifico (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	<i>B. afzelii</i> PKo (originariamente isolato in Germania da lesione da eritema migrante umano) / purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA
<b>BBA36 (iv1)*, ricombinante</b>	Antigene di <i>B. burgdorferi</i> espresso <i>in vivo</i> con peso molecolare di 22 kDa, codificato su lp54. BBA36 mostra epitopi conservati – intragenospecie – altamente immunogeni. BBA36 è un importante marker per borreliosi di Lyme in stadio avanzato (infezioni disseminate) nella sierologia delle IgG (10).	Altamente specifico	<i>B. afzelii</i> MMS (originariamente isolato in Germania da una zecca infetta) / purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA
<b>BBO323 (iv2)*, ricombinante</b>	Antigene di <i>B. burgdorferi</i> espresso <i>in vivo</i> con peso molecolare di 42 kDa, codificato da cromosoma. BBO323 mostra epitopi conservati – intragenospecie – altamente immunogeni. BBO323 è un importante marker per borreliosi di Lyme in stadio avanzato (infezioni disseminate) nella sierologia delle IgG. (54)	Specifico	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (originariamente isolato in Germania da una zecca infetta) / purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA
<b>Crasp3 (iv3)*, ricombinante</b>	<b>Complement regulator-acquiring surface protein3.</b> Antigene di superficie di <i>B. burgdorferi</i> espresso <i>in vivo</i> con peso molecolare di 21 kDa, codificato su cp32-8. Membro della famiglia Erp. Importante marker per borreliosi di Lyme in stadio avanzato (infezioni disseminate) nella sierologia delle IgG. Crasp3 supporta la resistenza del complemento (11, 54).	Altamente specifico	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (originariamente isolato in Germania da una zecca infetta) / purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA
<b>pG (iv4)*, ricombinante</b>	Antigene di <i>B. burgdorferi</i> espresso <i>in vivo</i> con peso molecolare di 22 kDa, codificato su cp32-3. Membro della famiglia Erp. Importante marker per borreliosi di Lyme in stadio avanzato (infezioni disseminate) nella sierologia delle IgG (16).	Altamente specifico	<i>B. burgdorferi</i> ZS7/ <i>B. afzelii</i> MMS (originariamente isolato in Germania da una zecca infetta) / purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA
<b>EBV VCA-gp125</b>	“Virus Capsid Antigen” (antigene virocapsidico) del virus di Epstein-Barr immunodominante. Gli anticorpi IgM anti-VCA-gp125 scompaiono di norma alcune settimane dopo l'infezione da EBV.	Marker altamente specifico nella sierologia delle IgM per una infezione	La purificazione di gp125 avviene da lisato cellulare totale (cellule umane infettate da

		primaria da EBV	EBV) mediante cromatografia di affinità utilizzando un anticorpo monoclonale anti-gp125
<b>Treponema pallidum Tpn17 ricombinante (solo per WE223G)</b>	Marker per sifilide primaria, secondaria e latente	altamente specifico per tutti gli stadi dell'infezione	<i>Treponema pallidum</i> / Purificato da <i>E. coli</i> tramite cromatografia di affinità Ni-NTA

\*(iv1-4) = antigene espresso in vivo (iv)

#### 9.4 Criteri di valutazione

L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio disponibili.

##### Valutazione globale raccomandata (IgM + IgG) dell'antigene anti Borrelia

Al fine di formulare una diagnosi certa di Borrelia, si raccomanda di eseguire il test LINE nelle IgG e IgM ed eseguire l'analisi in modo comune.

**Si valuteranno come positive soltanto le bande che presentano un'intensità  $\geq$  alla banda cut off.**

Bande presenti in IgM		Bande presenti in IgG	Valutazione
Nessuna banda o < banda cut off	<b>oppure</b>	Nessuna banda o < banda cut off  <b>oppure</b>  1 banda IgG (tranne VlsE)	<b>Negativo</b>
1 banda IgM (tranne OspC)	<b>oppure</b>	Banda IgG VlsE	<b>Al limite</b>
Banda IgM OspC  <b>oppure</b>  $\geq 2$ bande IgM	<b>oppure</b>	$\geq 2$ bande IgG	<b>Positivo</b>
1 bande IgM	<b>e</b>	1 bande IgG	<b>Positivo (*)</b>

(\*) La costellazione delle bande sulla riga a sfondo grigio mostra la combinazione di una sola banda in IgM più una banda in IgG da valutare come positiva nella valutazione globale (IgM+IgG).

##### Valutazione raccomandata in caso di EBV-gp125 positivo nella serologia delle IgM

Nel quadro di un'infezione primaria da EBV, a seguito della stimolazione policlonale delle cellule B possono manifestarsi reattività degli anticorpi nei confronti dell'antigene della *Borrelia burgdorferi* sensu lato, con conseguente risultato falsamente positivo per la borreliosi di Lyme (55). Per ridurre al minimo questa diagnosi errata, il test VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot contiene il **Viral Capsid Antigen** (antigene virocapidico) gp125 del virus di Epstein-Barr. Se nella serologia delle IgM e/o delle IgG, oltre agli antigeni della Borrelia reagiscono anche gli gp125 ad un'intensità  $\geq$  alla banda cut off delle IgM, per sicurezza si raccomanda di controllare lo stato completo di EBV del siero (ad es. con il test VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; art. n°: WE102G32/96 e VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot; art. n°: WE102M32/96).

La banda **EBV-gp125** non è convalidata per l'applicazione nella diagnostica su liquor.

## Valutazione raccomandata della banda TpN17

### La banda dell'antigene TpN17 *Treponema pallidum* (solo per WE223G)

Nella diagnostica su siero per la borreliosi di Lyme si osservano reazioni crociate con altri microrganismi. A tale riguardo rivestono un ruolo significativo le infezioni da virus erpetico (in particolare l'EBV) nonché le patologie batteriche, come la sifilide. La MiQ12/2000 per la borreliosi di Lyme raccomanda quanto segue: "In caso di test di ricerca al limite o positivo (nota: serologia della borreliosi di Lyme) occorre eseguire un test di ricerca della sifilide (ad es. TPHA), per escludere falsi positivi dovuti ad anticorpi a reattività crociata anti-treponemi."

La banda TpN17 consente il riconoscimento di risultati falsi limite/falsi positivi nella diagnostica su siero della borreliosi di Lyme tramite anticorpi a reazione crociata in base a un'infezione da *Treponema pallidum* (sifilide).

Se nel test VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot la banda TpN17 reagisce a un'intensità  $\geq$  alla banda cut off delle IgM e contemporaneamente reagisce anche l'antigene della Borrelia nell'IgM e/o nell'IgG, per sicurezza si raccomanda di controllare lo stato completo della sifilide del siero (ad es. con il test VIROTECH *Treponema pallidum* IgG LINE Immunoblot; art. n°: WE150G16/32 e VIROTECH *Treponema pallidum* IgM LINE Immunoblot; art. n°: WE150M16/32).

È indispensabile tenere presente quanto segue:

- La banda TpN-17 non può sostituire una diagnosi differenziale completa di sifilide in termini di sensibilità e specificità.
- Una banda dell'antigene TpN17 negativa non esclude sostanzialmente l'eventuale presenza di anticorpi anti-*Treponema pallidum*.
- Un risultato positivo della banda dell'antigene TpN17 deve essere garantito da opportuni test di conferma di *Treponema pallidum* (ad es.: WE150 di VIROTECH).
- La banda TpN-17 non è convalidata per l'applicazione nella diagnostica su liquor.

### Costellazione tipica di risultati

La sequenza degli antigeni sulle strip del test Borrelia in vivo LINE è stata selezionata in modo che, sulla parte superiore della strip (vicino alla linea di marcatura), si trovino antigeni (ad es.: OspC, VIsE-IgM, VIsE-IgG) che reagiscono prevalentemente con anticorpi di pazienti affetti da borreliosi di Lyme in fase precoce. Gli antigeni (ad es.: p83, BBA36, BBO323, Crasp3, pG), che reagiscono prevalentemente con anticorpi di pazienti affetti da borreliosi di Lyme in fase avanzata, si trovano nella parte inferiore della strip (lontano dalla linea di marcatura). In tal modo, già l'impressione visiva della suddivisione delle bande fornisce un'indicazione dello stadio dell'infezione (dalla borreliosi di Lyme in fase precoce a quella in fase avanzata).

### Esempi di costellazioni frequenti delle bande per i seguenti stadi dell'infezione:

Stadio borelliosi	Serologia delle IgM	Serologia delle IgG
<b>Borreliosi di Lyme in fase precoce</b>	OspC	VIsE
	VIsE	VIsE
	p39	VIsE
	$\geq 2$ bande	nessuna o VIsE
	OspC	nessuno
<b>Borreliosi di Lyme disseminata</b>	Possono comparire da nessuna a tutte le bande IgM.	VIsE e p39
		2 bande
<b>Borreliosi di Lyme in fase avanzata</b>	Le bande IgM si presentano sempre sullo sfondo	Con il progredire dell'infezione, di norma si manifesta anche un numero crescente di bande IgG nelle più svariate combinazioni. p39, p83, VIsE, iv1-4 (BBA36, BBO323, Crasp3 e pG)

## 9.5 Limiti del test

1. Un risultato negativo del Blot non esclude completamente la possibilità di un'infezione da *B. burgdorferi* s.l.. Il campione può essere stato prelevato prima della comparsa degli anticorpi oppure gli anticorpi si trovano al di sotto del limite d'individuazione del test.
2. Il trattamento dei pazienti con antibiotici nello stadio precoce della malattia (35, 37) può determinare una soppressione della risposta immunitaria, che rende impossibile rilevare gli anticorpi specifici anti *B. burgdorferi*.
3. La reazione crociata tra *Borrelia* e altre spirochete può avere come conseguenza la comparsa di bande associate alla *Borrelia*, reazione che può comportare un risultato falsamente positivo. Si possono osservare reazioni crociate in pazienti che presentano, ad es., le seguenti infezioni: sifilide (*Treponema pallidum*), framboesia (*Treponema pertenue*), febbre ricorrente (*Borrelia* spec.), leptospirosi (*Leptospire* spec.) (38). Possono aversi reazioni crociate anche nei virus erpetici (CMV, HSV, parvovirus) (34, 39). Nel caso in cui durante il test VIROTECH *Borrelia* in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE223G), oltre alle reattività nei confronti degli antigeni della borreliosi di Lyme si manifesti anche una reattività nei confronti dell'antigene TpN17, occorre tenere conto delle avvertenze riportate al punto 9.4 (Valutazione raccomandata della banda TpN17).
4. Nel quadro di un'infezione primaria da EBV, a seguito della stimolazione policlonale delle cellule B possono manifestarsi reattività degli anticorpi nei confronti dell'antigene della *Borrelia burgdorferi* sensu lato (34, 39). Nel caso in cui, durante il test VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE Immunoblot, oltre alle reattività delle IgM e/o delle IgG nei confronti dell'antigene della *Borrelia* si manifesti anche una reattività verso l'EBV-gp125, si deve escludere una mononucleosi tramite diagnosi differenziale.
5. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); in tal caso non eseguire la valutazione, ossia l'Immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con altri opportuni metodi.

## 10. Bibliografia

---

1. Aguero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; *Cell* 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis.* 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease *J. infect Dis.* 176:392-400
5. Engstroem et al., 1995 Immunoblot Interpretation criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. *J. Clin. Microbiol.* 33:419-427
6. Fawcett et al., 1993 Detection of antibody to the recombinant P39 protein of *Borrelia burgdorferi* using enzyme immunoassay and immunoblotting. *J. Rheumatol.* 20:734-738
7. Wilske et al., 12/2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik für Lyme-Borreliose, pp. 38ff., Urban&Fischer Verlag
8. Hauser et al., 1997 Interpretation criteria for Standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Clin. Microbiol.* 35:1433-1444
9. Marianne J. Mathiesen et al., 1996 Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*. *Med. Microbiol. Immunol.* 185:121-129
10. Wallich, R. et al.; Artificial-infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease; *Eur. J. Immunol.* 2003. 33:708-719
11. Kraiczy, P. et al.; Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family; *Eur. J. Immunol.* 2003. 33:697-707
12. LeFebvre et al., 1990 The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. *Clin. Microbiol.* 28:1673-1676
13. Luft et al., 1992 The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. *Infect. Immun.* 60:4309-4321
14. Ma et al., 1992 Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 30:370-376
15. Moskophidis et al., 1995 Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme Borreliose. *lab. Med.* 19:231-237
16. Wallich, R. et al.; Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo; *Infection and Immunity* 1995 Sept:3327-3335

17. Roessler et al., 1995 Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates Med. Microbiol. Immunol. 184:23-32
18. Roessler et al., 1997 Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Influence of Interspecies variability on Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 35:2725-2758
19. Simpson et al., 1990 reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28:1329-1337
20. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
21. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests, J. Inf. Dis. 149:789-95
22. Wilske et al., 1986 Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 263:92-102
23. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54
24. Wilske et al., 1988 Immunochemische Analyse der Immunantwort bei Spätmanifestationen der Lyme Borreliose. Zbl. Bakt. Hyg. A 267:549-558
25. Pfister, H.-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
26. Wilske & Preac-Mursic 1993 Microbiological diagnosis of Lyme Borreliose in: Aspects of Lyme borreliosis: Weber, Burgdorferi eds. Springer, Berlin 267-300
27. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994), Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis, J. Infect. Dis. 169: 313-318
28. Wilske et al., 1993 Immunological and Molecular Polymorphism of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 61:2182-2191
29. Wilske et al., 1994 Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. 183:43-59
30. Wilske, 1995 Diagnostik der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. Internist 36:114-119
31. Wilske et al., 1997 *Borrelien*. Diagnostische Bibliothek 48:1-12, Blackwell Verlag
32. Zöller et al., 1991, Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis, J. Clin. Microbiol. 29:174-182
33. Oschmann und Kraiczky, (1998), Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis“, UNI-MED-Verlag
34. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130
35. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelieninfektion, Clin. Lab. 44: 897-902
36. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78: 934-39
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
38. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156: 183-88
39. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, Infection 27 No.3: 231
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
42. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B. (2007) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. Nov. Int J Med Microbiol. 2008; 298(3-4): 279-90
43. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczky, P. (2007) Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resist complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and FHL-1. Infect Immun. 75(10): 4817-25
44. Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J. (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 37: 3025-3028

45. Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten –Teil44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.
46. Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3142-3147
47. Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun* 74: 3554-3564
48. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2006) Constitutive expression of outer surface protein C diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. *Infect Immun* 74: 5177-5184
49. Xu, Q., McShan, K., Liang, F.T. (2007a) Identification of an ospC operator critical for immune evasion of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 64: 220-231
50. Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P. (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. *Infect Immun* 75: 1517-1519
51. Bankhead, T., Chaconas, G. (2007) The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. *Mol Microbiol.* 65(6): 1547-58
52. Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., Stevenson, B. (2006) Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. *J Bacteriol* 188: 4879-4889
53. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. *Mol Microbiol* 60: 1319-1322
54. Nowalk et al. (2006), Serologic Proteome Analysis of *Borrelia burgdorferi* Membrane-Associated Proteins, *Infection and Immunity* 74, No.7: 3864-3873
55. Poggensee, G. et al (2008), Lyme.Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze, *Bundesgesundheitsblatt* 50: 1329-1339

## 11. Simboli

---



Vedere le Istruzioni per l'Uso

## 12. Schema di svolgimento del test

### Esecuzione del test in breve:

Preincubazione	<b>30 minuti</b>	15 µl di siero/plasma del paziente / 100 µl di controllo in 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
Lavaggio	<b>3 x 5 minuti</b>	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
Incubazione coniugato	<b>30 minuti</b>	Con 1,5 ml di diluizione d'uso ( 1 + 100 )
Lavaggio	<b>3 x 5 minuti</b> <b>1 x 1 minuto</b>	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio Con acqua distillata/deionizzata
Incubazione substrato	<b>10 ± 3 minuti</b>	Con 1,5 ml per campione di soluzione per substrato
Arresto	<b>3 x senza incubazione intermedia</b>	Con 1,5 ml per campione di acqua distillata/deionizzata.

### Tabella di diluizione coniugato: (valori arrotondati)

Numero strisce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampone di diluizione/lavaggio	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
coniugato Concentrato	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volumi finali	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Numero strisce	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampone di diluizione/lavaggio	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
coniugato Concentrato	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volumi finali	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Numero strisce	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampone di diluizione/lavaggio	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
coniugato Concentrato	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volumi finali	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Numero strisce	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampone di diluizione/lavaggio	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
coniugato Concentrato	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volumi finali	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml