

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgG LINE-32)

N.º de encomenda: WE242G32

(Y. enterocolitica IgG LINE-96)

N.º de encomenda: WE242G96

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgA LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgA LINE-32)

N.º de encomenda: WE242A32

(Y. enterocolitica IgA LINE-96)

N.º de encomenda: WE242A96

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Alemanha

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Índice

1. Utilização.....	3
2. Princípio do teste	3
3. Conteúdo da embalagem.....	3
3.1 Kit para 32 determinações	3
3.2 Kit para 96 determinações	3
4. Conservação e prazo de validade do kit e dos reagentes.....	4
5. Medidas de precaução e avisos.....	4
6. Material adicionalmente necessário (não fornecido).....	4
7. Material de análise	5
8. Realização do teste	5
8.1 Preparação da amostra	5
8.2 Preparação dos reagentes	5
8.3 Execução do teste Immunoblot	5
8.4 Utilização de processadores automáticos.....	6
9. Avaliação do teste.....	6
9.1 Utilização do controlo cut off	7
9.2 Significado dos antígenos	7
9.3 Critérios de avaliação.....	7
9.4 Limites do teste	8
10. Literatura.....	8
11. Símbolos	9
12. Esquema de realização do teste	10

1. Utilização

Kit de teste Line Immunoblot para a comprovação qualitativa de anticorpos IgG / IgA específicos no soro humano, dirigidos contra os antígenos do plasmídeo de virulência de 70 kb de yersínias patogénicas. A comprovação de bandas reactivas contribui para o diagnóstico de uma doença subsequente associada às yersínias (por exemplo, a artrite reactiva). O teste não é adequado para o diagnóstico de doenças entéricas agudas.

2. Princípio do teste

As proteínas do antígeno do agente patogénico são aplicadas a uma membrana de nitrocelulose usando um método de pulverização especial, ao que se segue o corte da membrana de nitrocelulose em tiras individuais.

A incubação das tiras de nitrocelulose que contêm o antígeno com amostras de soro/plasma humano permite comprovar a existência de anticorpos específicos. Estes anticorpos formam imunocomplexos juntamente com os antígenos fixados na tira de teste. Depois de remover os anticorpos não ligados através de vários passos de lavagem, as várias tiras de nitrocelulose são incubadas com anticorpos IgG ou IgA anti-humanos conjugados à fosfatase alcalina. Depois de remover os anticorpos conjugados não ligados através de mais um passo de lavagem, procede-se à visualização dos complexos antígeno/anticorpo (dos anticorpos ligados), através da adição de um substrato incolor que durante a sua transformação enzimática produz bandas azul/violetas ("bandas de antígeno"). A reacção enzima/substrato é parada pela lavagem das tiras de nitrocelulose com água destilada/desionizada. Em função do padrão que se observa na banda, poderá concluir-se a existência ou não de anticorpos IgG ou IgA específicos.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit para 32 determinações

1. Tiras de teste de nitrocelulose com antígenos, reforçadas com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar	1x	32 tiras
2. Controlo cut off de IgG ou IgA , soro humano, pré-diluído	1x	1,0 ml
3. Tampão de diluição/lavagem , pH 7,3 (10x conc.), com tris e conservante	2x	50 ml
4. Conjugado IgG ou IgA (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante	1x	0,7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar	1x	57 ml
6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados	1x	1 unid.

3.2 Kit para 96 determinações

1. Tiras de teste de nitrocelulose com antígenos, reforçadas com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar	3x	32 tiras
2. Controlo cut off de IgG ou IgA , soro humano, pré-diluído	2x	1,0 ml
3. Tampão de diluição/lavagem , pH 7,3 (10x conc.), com tris e conservante	4x	50 ml
4. Conjugado IgG ou IgA (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante	3x	0,7 ml
5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar	3x	57 ml
6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados	3x	1 unid.

A pedido pode ser adquirido adicionalmente:

IgG ou IgA - Controlo positivo, soro humano, pré-diluído, 1,0 ml.

As bandas positivas > bandas cut off constam do certificado fornecido.

(N.º de referência: IgG: WE242P60 ou IgA: WE242P40)

IgG/IgA- Controlo negativo, soro humano, pré-diluído, 1,0 ml.

O controlo negativo não mostra bandas, ou seja, bandas relevantes para a avaliação > bandas cut off.

(N.º de referência: IgG/IgA: WE242N20)

4. Conservação e prazo de validade do kit e dos reagentes

Guardar o kit de teste a uma temperatura de 2 – 8 °C. O prazo de validade dos vários componentes é indicada na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

1. Não congelar os vários reagentes e não expô-los a temperaturas elevadas.
2. Não usar os reagentes se o prazo de validade estiver ultrapassado.
3. Evitar guardar os reagentes num ambiente de luz forte.
4. A solução de substrato BCIP/NBT é sensível à luz e deve ser guardado num local escuro.
5. **Tiras de teste de nitrocelulose:** Usar as tiras imediatamente depois de as ter tirado do saco. Fechar bem novamente o saco com as tiras não usadas e guardá-lo a uma temperatura de 2 – 8 °C. Para arquivar os resultados, é absolutamente necessário guardar as tiras de teste de nitrocelulose protegidas da incidência directa da luz solar, a fim de evitar o desvanecimento das bandas.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Amostras	Não diluído	+2 a +8°C	1 semana
Tiras de teste	Depois de abrir	+2 a +8°C (armazenamento dentro do saco fornecido)	3 meses
Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Diluído	+2 a +8°C	Aprox. 6h
Substrato	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +8°C	4 semanas
	Estado diluído final (pronto a usar)	ou temperatura ambiente	2 semanas

5. Medidas de precaução e avisos

1. Como soros de controlo são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de VIH-1, VIH-2, HCV e ao antigénio de superfície de hepatite B. Mesmo assim, os soros de controlo, as amostras, amostras diluídas, os conjugados e as tiras de teste de microcelulose devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Para a realização do imunoblot devem ser usadas luvas descartáveis e uma pinça de plástico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.
4. As tinas de incubação foram concebidas pelo fabricante para o uso único. Uma utilização repetida das tinas de incubação é da responsabilidade do utilizador. Se as tinas de incubação forem usadas várias vezes, recomendamos que depois do seu uso sejam desinfectadas durante várias horas numa solução de hipoclorito de sódio e depois lavadas e passadas exaustivamente por água proveniente da rede de abastecimento e água destilada/desionizada.

6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)

1. Tina de incubação (se necessário pode ser adquirida com o n.º de art. WE300.08)
2. Agitador (vertical, não centrifugal)
3. Um frasco de lavagem para parar
4. Pipeta ou dispositivo de lavagem manual
5. Micropipetas 5 µl - 1500 µl
6. Pontas de pipeta
7. Tubos para amostras com 2 – 20 ml de volume
8. Pinça de plástico
9. Água destilada ou desionizada
10. Papel de filtro

7. Material de análise

Como material de análise podem ser usados soro e plasma (o tipo de anticoagulantes não é relevante), mesmo se neste folheto se refere apenas o soro.

8. Realização do teste

O cumprimento exacto das instruções de trabalho é uma condição essencial para a obtenção de resultados correctos.

8.1 Preparação da amostra

1. Por cada amostra de paciente são necessários 15 µl de soro ou plasma.
2. As amostras de sangue devem ser colhidas de forma asséptica por punção da veia. Após a coagulação completa deve ser separado o soro (não se aplica ao plasma). Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados a -20°C.
3. Não voltar a congelar e descongelar os soros.
4. Não devem ser usados soros inactivados pelo calor, lipémicos, hemolizados ou microbianamente contaminados porque podem originar resultados errados.
5. Não usar amostras de soro turvas (sobretudo depois da descongelação), eventualmente centrifugar (5 min. a 1.000x g), pipetar o sobrenadante límpido e usar no teste.

8.2 Preparação dos reagentes

1. Para a adaptação à rotina do laboratório, todos os LINEs podem ser usados no mesmo teste com os mesmos tempos de incubação e componentes com parâmetros e lotes abrangentes. Os controlos cut off são utilizados especificamente para os parâmetros e lotes.
2. Antes de diluir todos os reagentes do teste, o respectivo concentrado deverá ter atingido temperatura ambiente. Usar apenas água destilada/desionizada de qualidade elevada e à temperatura ambiente.
3. Antes da preparação do teste misturar bem os diluentes.
4. **Tampão de diluição/lavagem**
O tampão de diluição/lavagem existe numa concentração de 10 vezes. Diluir o concentrado de diluição/lavagem 1:10:00 com água destilada ou desionizada (10ml/50ml/100ml de concentrado + 90ml/450ml/900ml de água destilada/desionizada), misturar bem.
Tanto o tampão de diluição/lavagem concentrado como o diluído podem apresentar, eventualmente, uma coloração amarela. Esta coloração amarela não tem influência sobre o prazo de validade do tampão de diluição/lavagem nem sobre a funcionalidade ou capacidade de expressão diagnóstica do teste.
5. **Conjugado de IgG ou IgA**
Diluir o conjugado 1 + 100 com tampão de diluição/lavagem no estado diluído final e misturar bem. Por cada amostra de soro são necessários 1,5 ml de solução de conjugado. Ver tabela de diluição do conjugado (ponto: "Esquema de realização do teste").
6. **Substrato**
O substrato é fornecido pronto a usar.

8.3 Execução do teste Immunoblot

Atenção: As tiras de teste de nitrocelulose podem ser testadas apenas na respectiva classe Ig autorizada (ver etiqueta na caderneta de blot e a designação que consta nas várias tiras de teste).

Para a realização e avaliação correcta do LINE Yersinia enterocolitica deverá ser realizado em cada teste também um controlo cut off específico para cada parâmetro e cada lote.

1. O teste é realizado a temperatura ambiente.
2. Por cada amostra colocar 1 tira no sulco de uma tina de incubação limpa. Pegar as tiras apenas na ponta marcada superior.

3. Pipetar sempre 1,5 ml de **tampão de diluição/lavagem** pronto a usar e colocar sobre o agitador. Verificar se a tira de teste de nitrocelulose está uniformemente coberta de líquido, pois enquanto se realiza o teste as tiras não podem secar.
4. As tiras de teste de nitrocelulose reforçadas são humedecidas totalmente dentro de um minuto e podem ser incubadas deitadas de costas, de barriga ou de lado.
5. Adicionar com a pipeta sempre **15µl de soro/plasma de paciente** ou **100µl do controlo cut off / positivo / negativo**, se possível no extremo superior marcado da tira. Incubar o soro de paciente e o controlo durante **30 minutos** no agitador. Ao pipetar e durante a seguinte remoção do líquido, estar com atenção para que não haja contaminações cruzadas das várias amostras de paciente.
6. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitar o líquido fora com muito cuidado. Ao deitar o líquido fora as tiras de teste de nitrocelulose ficam agarradas ao fundo dos sulcos. Secar o líquido restante com um papel absorvente.
7. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. Antes de proceder ao último passo de lavagem preparar a quantidade necessária de diluente de conjugado fresco (ver tabela).
8. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6)..
9. Pipetar sempre 1,5 ml do **diluente de conjugado** obtido para os respectivos sulcos de incubação e incubar durante **30 minutos** no agitador.
10. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora.
11. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. A seguir, lavar durante **1 x 1 minuto** com **água destilada/desionizada**.
12. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6)..
13. Pipetar 1,5 ml da **solução de substrato** pronta a usar em cada sulco e revelar durante **10 ± 3 minutos** no agitador.
14. **Parar** a revelação da cor através da remoção do substrato. A seguir, lavar as tiras **3 x** com 1,5 ml de **água destilada/desionizada**, sem incubação intermédia.
15. Deitar a água destilada/desionizada fora e secar as tiras sobre um papel absorvente limpo. A coloração de fundo, observada em tiras de teste de nitrocelulose húmidas, desaparece totalmente quando as tiras estão secas. Em comparação com as tiras de teste de nitrocelulose habituais, as tiras de teste de nitrocelulose reforçadas levam mais tempo a secar.
16. Para a avaliação usar o registo de avaliação e a máscara específica do kit que acompanham a embalagem. A inscrição nas bandas altamente específicas na folha de registo facilita a avaliação das amostras de paciente.

Esquema de teste ver última página

8.4 Utilização de processadores automáticos

Para o processamento automatizado dos Blots e LINES estão validados os seguintes aparelhos: Apollo e Profiblot. Basicamente, são adequados todos os blots automáticos habituais.

9. Avaliação do teste

Para uma avaliação segura, cada tira de LINE proporciona dois controlos:

1. Controlo do soro (= serum control) :

A banda de incubação do soro aparece apenas depois da incubação com soro de paciente, aparecendo por baixo da linha de marcação (= markline).

2. Controlo do conjugado (= conjugate control):

A tira LINE está equipada com uma banda de controlo do conjugado que se torna visível depois da incubação com o respectivo conjugado.

O teste é válido se na tira de teste de nitrocelulose revelada estiver bem visível tanto o controlo de soro como também o controlo de conjugado interno.

A posição das bandas de soro e das bandas de controlo do conjugado consta na folha de registo.

9.1 Utilização do controlo cut off

As bandas cuja intensidade é mais fraca que a das bandas cut off YopD do controlo cut off não são utilizadas para a avaliação. Igualmente não utilizada para a avaliação é a banda de contaminação YopDD que só se encontra nas tiras de teste IgG. Uma banda YopDD $\geq$ cut off com serologia negativa é um indício para um contacto anterior com Yersinia.

9.2 Significado dos antígenos

Antígeno/ Denominação	Peso molecular	Significado dos antígenos	Especificidade dos anticorpos no LINE
YopM (2a)	48 kD	"Yersinia outer proteins" (Yop) são proteínas codificadas por plasmídeos que são removidas pelas bactérias e formadas por todas as yersínias humano-patogénicas.	Tanto os anticorpos IgG como também os anticorpos IgA contra "Yersinia outer proteins" e V-Ag são altamente específicos para uma infecção com yersínias patogénicas.
YopH (2b)	45 kD		
YopB (3)	42 kD		
V-Ag (17)	38 kD		
YopD (4a)	36 kD	O antígeno V ou também LcrV está sujeito aos mesmos regulamentos que os Yops, mas por razões históricas foi-lhe dado um nome diferente.	
YopE (5)	27 kD		

Não se verificam reacções cruzadas com salmonela tifimurium, campylobacter jejuni ou brucella (13, 14).

A banda YopDD (a última banda nas tiras de teste) que só existe na tira IgG não é utilizada para a avaliação. Uma banda YopDD com um resultado negativo numa intensidade $\geq$ que a banda cut off é um indício para um contacto anterior com yersinia.

9.3 Critérios de avaliação

A interpretação dos resultados serológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos disponíveis.

Banda(s) verificada(s)	Significado	Avaliação
Sem bandas $\geq$ bandas de cut off	Nenhum indício serológico para uma infecção com yersinia ou uma yersiniose antiga.	Negativo
Uma banda $\geq$ banda cut-off (excepto YopD)	Anticorpos contra yersínias podem ser comprovados. Reacção mais fraca em caso de reconvalescença, anticorpos persistentes ou no começo de uma infecção. Recomenda-se a realização de um controlo evolutivo.	Suspeito
YopD isoladas (36 kD) $\geq$ bandas cut-off.	Anticorpos contra yersínias podem ser comprovados. Mais de 90% dos pacientes com artrite de yersinia formam anticorpos IgA contra YopD. Mas também poderá tratar-se de uma infecção recente ou de anticorpos persistentes.	Positivo
Duas bandas $\geq$ bandas de cut off	Anticorpos contra yersínias podem ser comprovados. Uma infecção é provável. Os anticorpos IgG e IgA podem persistir durante vários anos.	Positivo
YopDD (contaminação) $\geq$ banda cut off	Banda de contaminação positiva. Indício para um contacto anterior com yersinia	

Para a avaliação dos resultados IgA devem ser tidos em consideração também os resultados IgG, uma vez que fortes intensidades de banda e um número elevado de bandas no IgG e IgA representam a imagem serológica típica de uma artrite reactiva induzida por yersínia (8).

O Yersínia enterocolítica LINE tem um ajuste específico no IgG, a fim de serem abrangidas apenas titulações nítidas. Um indício para uma contaminação geral no IgG é fornecido pela banda de contaminação YopDD que indica um contacto anterior com yersínias.

9.4 Limites do teste

1. Nos casos em que se suspeita de yersínias, o diagnóstico deve considerar sempre tanto os resultados IgA como também os resultados IgG do LINE.
2. A persistência dos anticorpos IgA após um tratamento bem sucedido pode durar entre 6 meses e 3 anos. Os anticorpos IgG persistem, normalmente, durante muitos anos.
3. Embora a importância a nível de diagnóstico diferencial seja nula, teoricamente não é possível excluir por completo reacções cruzadas com soros dirigidos contra *Pseudomonas aeruginosa*. Na *P. aeruginosa*, um patógeno oportunista, que normalmente infecta apenas indivíduos imunocomprometidos, foram encontrados os chamados "type III secretion machines" funcionalmente similares [YopB e YopD homólogos a PopB e PopD] (18, 19).
4. O LINE Yersínia enterocolítica não é adequado para o diagnóstico de doenças entéricas agudas.
5. Em casos isolados, os soros de paciente podem mostrar bandas "inversas" (fundo escuro, bandas brancas); estas não devem ser consideradas, o que significa que, neste caso, o Immunoblot não pode ser utilizado. O soro deve ser analisado por outros métodos serológicos.

10. Literatura

1. Psychrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 1997
2. K. Ito et. al., "Colonization in the tonsils of swine by Yersinia enterocolitica." Contrib Microbiol Immunol 1991; 12: 63-7.
3. Fachinformation Labkrone website, "Yersinia" (08/2010)
4. J. de Koning et. al., "Klinik, Diagnostik und Therapie von Yersinia-enterocolitica-Infektionen." Immun. Infekt. 18 (6/90), 192-197.
5. H. Zeidler et. al, Yersinien-induzierte Arthritiden : Neue Erkenntnisse in Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Rheumatologie-Hannover, WMW Nr.12, 1990 306-311
6. J-U Asmussen et.al., Long term prognosis in Yersinia arthritis: clinical and serological findings. Annals of the Diseases 1992;51:1332-1334
7. Kern et. al., "Yersinia-enterocolitica-infektion mit extraintestinaler Manifestation: Fallbericht und Übersicht." Z. Gastroenterol 1994; 32: 152-156
8. www.rheuma-online.de "Yersinien-induzierte Arthritis" (06/2003)
9. Cornelis G.R. et. al.: "The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome." Microbiol-Mol-Biol-Rev. 1998 Dec; 62(4): 1315-52
10. The Journal of infectious diseases, Vol. 157, No. 3, March 1988, pages 601-602.
11. Auli Toivanen et. al., Immunoblot analysis of human IgM, IgG and IgA responses to plasmid-encoded antigens of Yersinia enterocolitica serovar O3. J. Med. Microbiol. -Vol.24(1987), 157-163.
12. Reviews of infectious diseases, Vol. 6, No. 3, May-June 1984, pages 421-422.
13. Gaede-K, Mack-D, Heesemann-J, "Experimental Yersinia enterocolitica infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats"; Med Microbiol Immunol (1992)181;165-172.
14. Ståhlberg T.H., J. Heesemann, K. Granfors, A. Toivanen, (1989) : Immunoblot analysis of IgM, IgG and IgA responses to plasmid encoded released proteins of Yersinia enterocolitica in patients with or without yersinia triggered reactive arthritis., Annals of the Rheumatic Diseases, 48: 577-581
15. Peter J.B. et. al.: Use and Interpretation of Laboratory Tests in Infectious Disease", Specialty Laboratories, 1998. 262-64
16. Mäki-Ikola, O., J. Heesemann, A. Toivanen, K. Granfors.: High frequency of Yersinia antibodies in healthy populations in Finland and Germany, Rheumatol. Int., 1997, 16:227-229
17. Straley S.C. et al.: Yops of Yersinia spp. pathogenic for humans, Infection and Immunity, Aug 1993: 3105-3110

18. Schneewind O. et al.: Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals, Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Oct 26;96(22):12839-43.
19. Forsberg A. et.al.: Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol Microbiol. 1998 Sep;29(5):1155-65.

11. Símbolos



=> Ver instruções de utilização

12. Esquema de realização do teste

Realização do teste numa forma sucinta:

Incubação de amostras	30 minutos	15 µl de soro/plasma de paciente /100 µl de controlo cada um em 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem
Lavar	3 x 5 minutos	Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem
Incubação do conjugado	30 minutos	Com 1,5 ml de conjugado diluído (1 + 100)
Lavar	3 x 5 minutos 1 x 1 minuto	Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem Com água destilada/desionizada
Incubação do substrato	10 ± 3 minutos	Com 1,5 ml de substrato
Parar	3 x sem incubação intermédia	Com 1,5 ml de água destilada/desionizada

Tabela de diluição do conjugado: (arredondado)

Número de tiras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampão de diluição/lavagem	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Concentrado de conjugado	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

Número de tiras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampão de diluição/lavagem	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Concentrado de conjugado	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

Número de tiras	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampão de diluição/lavagem	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Concentrado de conjugado	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

Número de tiras	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampão de diluição/lavagem	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Concentrado de conjugado	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