

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgG LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgG LINE-32)

N° articolo: WE242G32

(Y. enterocolitica IgG LINE-96)

N° articolo: WE242G96

VIROTECH Yersinia enterocolitica IgA LINE Immunoblot

(Y. enterocolitica IgA LINE-32)

N° articolo: WE242A32

(Y. enterocolitica IgA LINE-96)

N° articolo: WE242A96

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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

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



Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test.....	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Kit per 32 determinazioni	3
3.2 Kit per 96 determinazioni	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi	3
5. Precauzioni e avvertenze.....	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito)	4
7. Materiale di analisi	5
8. Esecuzione del test	5
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
9. Valutazione del test.....	6
9.1 Impiego del controllo cut off	6
9.2 Significato degli antigeni	7
9.3 Criteri di valutazione.....	7
9.4 Limiti del test	8
10. Bibliografia.....	8
11. Simboli.....	9
12. Schema di svolgimento del test.....	10

1. Finalità d'uso

Kit Line Immunoblot per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG/ IgA specifici nel siero umano, che sono diretti contro gli antigeni del plasmide di virulenza di 70kb delle Yersinie patogene. La determinazione di bande reattive contribuisce alla diagnosi di patologie associate alle Yersinie (ad es. artrite reattiva). Il test non è idoneo per formulare la diagnosi di patologie enteriche acute.

2. Principio del test

Le proteine dell'antigene patogeno vengono trasferite 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 IgA 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 IgA.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per 32 determinazioni

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

3.2 Kit per 96 determinazioni

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

Su richiesta sono disponibili anche:

Controllo positivo per IgG o IgA, siero umano, prediluito, 1,0 ml.

Per le bande positive > banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE242P60 o IgA: WE242P40)

Controllo negativo per IgG/IgA, siero umano, prediluito, 1,0 ml.

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

(Art. n°: IgG/IgA: WE242N20)

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.

8. Esecuzione del test

Il rigoroso rispetto del metodo indicato da VIROTECH Diagnostics 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.
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 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 IgA**
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 LINE per la Yersinia, utilizzare anche un controllo cut off per ogni serie di test.

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 Impiego del controllo cut off

Le bande la cui intensità è inferiore alla banda cut off YopD del controllo cut off, non vengono incluse nella valutazione.

Nella valutazione non viene inclusa neppure la banda di contaminazione YopDD, che è applicata esclusivamente sulle strisce IgG. Una banda YopDD con intensità $\geq$ a quella della banda cut off in caso di sierologia negativa è indicativa di precedente contatto con Yersinia.

9.2 Significato degli antigeni

Denominazione antigene	Peso molecolare	Significato degli antigeni	Specificità degli anticorpi nel test LINE
YopM (2a)	48 kD	Le "Yersinia outer proteins" (Yop) sono proteine codificate da plasmide, che vengono traslocate dai batteri e sintetizzate da tutte le Yersinie patogene per l'uomo. L'antigene V o anche LcrV è soggetto agli stessi meccanismi di regolazione delle Yops e si chiama diversamente solo per motivi storici.	Sia gli anticorpi IgG che IgA contro le "Yersinia outer proteins" e gli antigeni V-Ag sono altamente specifici per un'infezione dai patogeni Yersinie.
YopH (2b)	45 kD		
YopB (3)	42 kD		
V-Ag (17)	38 kD		
YopD (4a)	36 kD		
YopE (5)	27 kD		

Non si verificano reazioni crociate con Salmonella thyphimurium, Campylobacter jejuni o Brucella (13, 14).

La banda YopDD (vale a dire l'ultima banda sulle strisce), presente soltanto sulle strisce IgG, non viene inclusa nella valutazione. Una banda YopDD in presenza di una banda negativa con intensità $\geq$ a quella della banda cut off è indicativa di precedente contatto con Yersinia.

9.3 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.

Banda/e presente/i	Significato	Valutazione
Nessuna banda $\geq$ banda cut off	Nessuna indicazione sierologia di infezione da Yersinia oppure di yersiniosi di vecchia data.	negativo
Una banda $\geq$ banda cut off (ad eccezione di YopD)	Sono individuabili anticorpi anti-Yersinia. Reazione attenuata in caso di convalescenza, anticorpi persistenti o di infezione in fase di esordio. È consigliabile un controllo a distanza di tempo.	incerto
YopD isolata (36 kD) $\geq$ banda cut off	Sono individuabili anticorpi anti-Yersinia. Oltre il 90% dei pazienti con artrite da Yersinia sintetizzano anticorpi IgA anti-YopD. Può trattarsi anche di un'infezione recente oppure di anticorpi persistenti.	positivo
Due bande $\geq$ banda cut off	Sono individuabili anticorpi anti-Yersinia. È probabile un'infezione. Gli anticorpi IgG e IgA possono persistere per anni.	positivo
YopDD (contaminazione) $\geq$ banda cut off	Banda di contaminazione positiva. Indicazione di un precedente contatto con Yersinia.	

Per valutare i risultati IgA si raccomanda di tenere conto, se possibile, anche dei risultati IgG, poiché una marcata intensità delle bande e un'elevata quantità di bande nella classe IgG e IgA sono rappresentative di un quadro sierologico caratteristico di un'artrite reattiva indotta da Yersinia (8).

Il test LINE per *Yersinia enterocolitica* è predisposto in modo specifico per la classe IgG affinché vengano rilevati solo titoli rilevanti. Una contaminazione generale nella classe IgG è segnalata dalla banda di contaminazione YopDD, che è indicativa di precedente contatto con *Yersinia*.

9.4 Limiti del test

1. Nella diagnosi di pazienti in cui si sospetta un'infezione da *Yersinia* vanno inclusi sia i risultati del test LINE per IgA che per IgG.
2. Gli anticorpi IgA possono persistere da 6 mesi a 3 anni in seguito a positiva conclusione del trattamento. Gli anticorpi IgG persistono di norma molti anni.
3. Sebbene non rilevante ai fini di una diagnosi differenziale, in teoria non sono da escludersi completamente reazioni crociate con sieri diretti contro *Pseudomonas aeruginosa*. Per la *P. aeruginosa*, un patogeno opportunistico che infetta di norma solo soggetti immunocompromessi, sono stati scoperti "sistemi di secrezione di tipo III" simili dal punto di vista funzionale [YopB e YopD omologhi a PopB e PopD] (18, 19).
4. Il test LINE per *Yersinia enterocolitica* non è idoneo per formulare la diagnosi di patologie enteriche acute.
5. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); non eseguire la valutazione di queste bande, poiché in questi casi l'immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con altri opportuni metodi sierologici.

10. Bibliografia

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. Simboli



Vedere le Istruzioni per l'Uso

12. Schema di svolgimento del test

Esecuzione del test in breve:

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