

# Kit Europe LINE per Borrelia

Line Immunoblot per IgG / IgM

**N° articolo:**

WE224G32 Line Immunoblot per IgG, 32 determinazioni  
WE224G96 Line Immunoblot per IgG, 96 determinazioni  
WE224M32 Line Immunoblot per IgM, 32 determinazioni  
WE224M96 Line Immunoblot per IgM, 96 determinazioni

# Kit Europe plus TpN17 LINE per Borrelia

Line Immunoblot per IgG

**N° articolo:**

WE225G32 Line Immunoblot per IgG, 32 determinazioni  
WE225G96 Line Immunoblot per IgG, 96 determinazioni

**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**

**Sekisui Virotech GmbH  
Löwenplatz 5**

**D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0**

**Fax: +49-6142-82621**

**<http://www.sekisuivirotech.com>**



Druckdatum 15.06.2015

REV 5 / Borrelia Europe LINE IgG/IgM / plus TpN17 IT

# 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 degli antigeni .....	7
9.4 Criteri di valutazione.....	8
9.5 Limiti del test .....	10
<b>10. Bibliografia.....</b>	<b>10</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 *Borrelia (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

---

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 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> | 0,5 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</b> con antigeni supportati, rinforzate 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> | 0,5 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</b> per protocollare e archiviare i risultati  | <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: WE224P60 / WE225P60 o IgM: WE224P80)

IgG/IgM e/o IgG – 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: WE224N10 o WE225N60)

#### 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 del metodo indicato da Sekisui Virotech 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 una corretta esecuzione e valutazione dei test Europe LINE per Borrelia, occorre includere anche un controllo cut off specifico dei parametri e del lotto per ogni serie di test.**

**Al fine di formulare una diagnosi certa di Borrelia, si raccomanda di eseguire il test Europe LINE per Borrelia nelle classi 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).
2. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
3. Dispensare 1,5 ml della **diluizione di coniugato** preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per **30 minuti** sull'agitatore.
4. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
5. **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**.
6. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
7. Dispensare 1,5 ml di **soluzione per substrato** pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per **10 ± 3 minuti**.
8. **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.
9. 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.
10. 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, DbpA-Mix e una banda EBV per la diagnosi di esclusione

**Bande delle IgG:** OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix oppure DbpA PKo, p58, p83 e una banda Tpn17 per la diagnosi di esclusione (solo per WE 225G)

### 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 degli antigeni

Elenco degli antigeni utilizzati purificati e ricombinanti anti *Borrelia burgdorferi*, del Viral Capsid Antigen (antigene virocapsidico) anti EBV gp125 e degli antigeni Tpn17. VlsE-Mix è costituito da due antigeni ricombinanti delle genospecie *Borrelia burgdorferi* sensu stricto e *Borrelia garinii*. DbpA-Mix è costituito dalle genospecie ricombinanti *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia spielmanii* e *Borrelia afzelii* altamente purificata.

Denominazione antigene	Significato degli antigeni	Specificità degli anticorpi nel test LINE
<b>OspC (p23) altamente purificato</b>	<b>Outer surface-protein C.</b> Lipoproteina codificata in un plasmide. (6, 22, 26, 28). Importante marker per manifestazioni precoci di borreliosi di Lyme, in particolare 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 l'OspC per il successo di un'infezione iniziale del mammifero ospite (48, 63, 70,71). Le spirochete esprimono l'OspC durante il pasto di sangue nella zecca e nella fase precoce dell'infezione nel mammifero ospite (48). Dopo il trasferimento delle spirochete sul mammifero, l'espressione dell'OspC-viene di nuovo regolata verso il basso. La lipoproteina non sembra essere necessaria per un'infezione persistente (48, 63). Tilly et al. ipotizzano che l'OspC prevenga la fagocitosi delle spirochete durante la fase precoce dell'infezione del mammifero ospite (64).	specifico (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)
<b>VlsE ricombinante</b>	<b>Variable major protein like sequence E.</b> Lipoproteina espressa <i>in vivo</i> , che mostra epitopi conservati (intra-genospecie) altamente immunogeni. Nella sierologia delle IgM si osservano reattività nei confronti di VlsE, in particolare in caso di sieri di pazienti con borreliosi di Lyme in fase precoce. Nella sierologia delle IgG si osservano reattività nei confronti di VlsE nei sieri di pazienti con borreliosi di Lyme in fase precoce e avanzata. 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 la loro risposta immunitaria attiva. Si suppone che a tale persistenza contribuisca la variazione combinatoria degli antigeni della proteina superficiale – come " meccanismo immune escape" (42, 44, 56).	specifico
<b>p39 (BmpA) ricombinante</b>	<b>Borrelial membrane protein A.</b> Marker centrale codificato in cromosoma (6, 19) nella sierologia delle IgG per infezioni disseminate di borreliosi di Lyme (4, 8, 18). Le proteine Bmp sono lipoproteine con funzione ancora sconosciuta (43, 57, 62).	altamente specifico (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)

<b>DbpA</b> altamente purificato/ ricombinate	<b>Decorin binding protein A</b> (anche nota come Outer surface protein 17 o p17). Lipoproteina codificata da plasmide. Le DbpA derivanti da diversi isolati delle specie patogene per l'uomo <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. bavariensis</i> e <i>B. spielmanii</i> sono state descritte come antigeni sensibili e specifici, che si completano reciprocamente in termini di reattività (47, 60, 61, 69). Sono marker nella sierologia delle IgM e IgG, soprattutto per la neuroborreliosi e l'artrite di Lyme (50, 52, 57, 58, 59, 60). <u>Significato biologico:</u> L'adesione microbica al tessuto ospite rappresenta una prima fase critica nella patogenesi della maggior parte delle malattie infettive. Le diverse specie di Borrelia esprimono due adesine leganti la decorina espresse sulla superficie (DbpA e B), che mediano il legame delle spirochete con la matrice extracellulare dell'ospite. Le borrelie giungono attraverso la saliva delle zecche nel derma, dove si legano alle fibre di collagene oppure, tramite le adesine A e B leganti la decorina, al proteoglicano decorina associato al collagene (46, 49, 72).	altamente specifico
<b>p58 (OppA-2)</b> ricombinante	<b>Oligopeptide permease protein A-2 (OppA-2)</b> . Lipoproteina codificata da cromosoma conservata tra le specie (54). Importante marker nella sierologia delle IgG per borreliosi di Lyme in fase avanzata (47, 51, 57, 67, 68). <u>Significato biologico:</u> OppA è un trasportatore di membrana che svolge probabilmente un ruolo nell'adattamento di <i>B. burgdorferi</i> sensu lato all'ambiente dell'ospite (55, 66).	Altamente specifico
<b>p83/100</b> ricombinate	Antigene codificato da cromosoma, associato a cilindro protoplasmatico (12, 13), conservato nella <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (17). Marker centrale nella sierologia delle IgG per borreliosi di Lyme in fase avanzata (8, 24, 29).	altamente specifico (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)
<b>EBV</b> <b>VCA-gp125</b>	<i>"Virus Capsid Antigen"</i> (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 un'infezione primaria da EBV
<b>Treponema pallidum TpN17</b> ricombinante (solo per WE223G)	Marker per sifilide primaria, secondaria e latente	altamente specifico per tutti gli stadi dell'infezione

#### 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.

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

##### Valutazione raccomandata delle IgM<sup>1</sup>

Banda/e comparse	Valutazione
Comparsa di $\geq 2$ bande fra le seguenti:	Positivo

<sup>1</sup> secondo MIQ 12/2000 e DIN 58969-44 luglio 2005 [7,73]

p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix <b>oppure</b> OspC (p23) isolata	
<b>Una sola banda di:</b> p39 BmpA, DbpA-Mix, VlsE-Mix	<b>Al limite</b>
<b>Nessuna delle seguenti bande con intensità <math>\geq</math> a quella della banda cut off:</b> p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix	<b>Negativo</b>

#### Valutazione raccomandata delle IgG<sup>1</sup>

Banda/e comparse	Valutazione
<b>Comparsa di <math>\geq 2</math> bande fra le seguenti:</b> p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix e/o DbpA-PKo, VlsE-Mix	<b>Positivo</b>
<b>Una sola banda di:</b> p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix e/o DbpA-PKo, VlsE-Mix	<b>Al limite</b>
<b>Nessuna delle seguenti bande con intensità <math>\geq</math> a quella della banda cut off:</b> p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix e/o DbpA-PKo, VlsE-Mix	<b>Negativo</b>

\* Le due bande DbpA (Mix e PKo) vengono valutate assieme come una sola banda nella classe IgG.

#### Valutazione raccomandata in caso di VCA-gp125 positivo nella sierologia 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. Per ridurre al minimo questa diagnosi errata, il test LINE per le IgM della Borrelia contiene il **Viral Capsid Antigen** (antigene virocaspidico) gp125 del virus di Epstein-Barr. Se, oltre gli gp125, reagiscono contemporaneamente anche gli antigeni della Borrelia (nella classe IgM e/o IgG) con un'intensità  $\geq$  a quella della banda cut off delle IgM, per ragioni di sicurezza si raccomanda di controllare lo stato completo di EBV del siero (ad es. con il test LINE per EBV di Virotech; art. n°: IgG: WE102G32/96 e IgM: WE102M32/96).

#### Valutazione raccomandata della banda Tpn17

##### La banda dell'antigene Tpn17 *Treponema pallidum* (solo per WE225G)

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: sierologia 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 LINE Europe plus TpN17 per Borrelia la banda TpN17 reagisce con un'intensità  $\geq$  a quella della banda cut off delle IgM e, contemporaneamente, reagiscono anche gli antigeni della Borrelia nella classe IgM e/o IgG, per ragioni di sicurezza si raccomanda di controllare lo stato completo della sifilide del siero (ad es. con il test LINE WE150 per *Treponema pallidum* di Virotech).

È indispensabile tenere presente quanto segue:

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

## 9.5 Limiti del test

1. Un risultato negativo del blot non esclude completamente la possibilità di un'infezione da Borrelia. 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 verificarsi reazioni crociate anche con virus erpetici (CMV, HSV) e Parvovirus (34, 39). Nel caso in cui durante il test Europe plus TpN17 LINE per Borrelia (WE223G) si manifestasse, oltre alla reattività nei confronti degli antigeni della borreliosi di Lyme, 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 LINE per Borrelia, si manifestasse, oltre alle reattività nei confronti degli antigeni della Borrelia (IgM e/o IgG), anche una reattività nei confronti dell'EBV-gp125, occorre escludere una mononucleosi mediante 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 antibodies 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 Kraiczy, (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 Borrelien infektion, 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. 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
43. Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Carbonaro, C.A., Wormser, G.P., Aguero-Rosenfeld, M.E., Cabello, F.C. (2005) *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in patients with Lyme disease. Clin Diagn Lab Immunol 12: 935-940
44. 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
45. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljić, 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
46. Fischer, J.R., Parveen, N., Magoun, L., Leong, J.M. (2003) Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 7307-7312
47. Göttner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., Fingerle, V. (2005) Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 43: 3602-3609
48. 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
49. Guo, B.P., Brown, E.L., Dorward, D.W., Rosenberg, L.C., Hook, M. (1998) Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 30: 711-723
50. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1998) Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Clin Diagn Lab Immunol 5: 456-462
51. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1999) Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 37: 2241-2247
52. Heikkilä, T., Seppälä, I., Saxen, H., Panelius, J., Yrjänäinen, H., Lahdenne, P. (2002) Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. J Clin Microbiol 40: 453-460
53. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczy, 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
54. Kornacki, J.A., Oliver, D.B. (1998) Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. Infect Immun 66: 4115-4122
55. Medrano, M.S., Ding, Y., Wang, X.G., Lu, P., Coburn, J., Hu, L.T. (2007) Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 189: 2653-2659
56. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
57. Nowalk, A.J., Gilmore, R.D., Jr., Carroll, J.A. (2006) Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. Infect Immun 74: 3864-3873

58. Panelius, J., Lahdenne, P., Saxen, H., Carlsson, S.A., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Lauhio, A., Seppala, I. (2003) Diagnosis of Lyme neuroborreliosis with antibodies to recombinant proteins DbpA, BBK32, and OspC, and VlsE IR6 peptide. *J Neurol* 250: 1318-1327
59. Panelius, J., Sillanpää, H., Seppala, I., Sarvas, H., Lahdenne, P. (2007) Antibodies to recombinant decorin-binding proteins A and B in the cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis. *Scand J Infect Dis* 39: 775-780
60. Schulte-Spechtel, U., Lehnert, G., Liegl, G., Fingerle, V., Heimerl, C., Johnson, B.J., Wilske, B. (2003) Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 41: 1299-1303
61. Schulte-Spechtel, U., Fingerle, V., Goettner, G., Rogge, S., Wilske, B. (2006) Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene transfer of the dbpA gene. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40: 250-266
62. Shin, J.J., Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Cabello, F.C. (2004) Localization of BmpA on the exposed outer membrane of *Borrelia burgdorferi* by monospecific anti-recombinant BmpA rabbit antibodies. *Infect Immun* 72: 2280-2287
63. 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
64. 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
65. 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
66. Wang, X.G., Kidder, J.M., Scagliotti, J.P., Klempner, M.S., Noring, R., Hu, L.T. (2004) Analysis of differences in the functional properties of the substrate binding proteins of the *Borrelia burgdorferi* oligopeptide permease (Opp) operon. *J Bacteriol* 186: 51-60
67. Wilske, B., Hauser, U., Lehnert, G., Jauris-Heipke, S. (1998) Genospecies and their influence on immunoblot results. *Wien Klin Wochenschr* 110: 882-885
68. Wilske, B., Habermann, C., Fingerle, V., Hillenbrand, B., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Pradel, I., Rossler, D., Schulte-Spechtel, U. (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 188: 139-144
69. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 13-21
70. 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
71. 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
72. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2007b) Increasing the interaction of *Borrelia burgdorferi* with decorin significantly reduces the 50 percent infectious dose and severely impairs dissemination. *Infect Immun* 75: 4272-4281
73. Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten -Teil 44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.

## 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>	Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio
	<b>1 x 1 minuto</b>	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