

PAL TEST

**Kit de dosage spécifique de la phosphatase alcaline
bovine dans les produits laitiers par
Immuncapture**

**Specific immunocapture assay kit for the detection
of bovine alkaline phosphatase in cow milk and
cow milk cheese**

**Manuel d'utilisation
Instruction manual**

PAL TEST

Référence catalogue E_PAL_001

6 barrettes de 16 puits

Catalogue reference E_PAL_001

6 strips of 16 wells

Kit de dosage spécifique de la phosphatase alcaline bovine dans les produits laitiers par immunocapture

Specific immunocapture assay kit for the detection of bovine alkaline phosphatase in cow milk and cow milk cheese

Ce document doit être lu dans son intégralité avant utilisation du test.

This document must be fully read before running the kit for the first time.

Quality Management System **ISO9001:2008** certified by



TABLE DES MATIERES

1.	INTRODUCTION	5
2.	DOMAINE D'APPLICATION	5
3.	PRINCIPE	5
4.	COMPOSITION DU KIT	6
5.	CONDITIONS DE STOCKAGE	6
6.	REACTIFS ET EQUIPEMENTS REQUIS	7
7.	PREPARATION DES REACTIFS	7
8.	PREPARATION DES ECHANTILLONS	8
9.	PREPARATION DES STANDARDS	10
10.	MODE OPERATOIRE	11
11.	RESULTATS	13
12.	CONSEILS TECHNIQUES	14
13.	CONSIGNES DE SECURITE	14
14.	CARACTERISTIQUES TECHNIQUES	14

TABLE OF CONTENTS

1.	INTRODUCTION	20
2.	FIELD OF APPLICATION	20
3.	ASSAY PRINCIPLE	20
4.	KIT CONTENT	21
5.	STORAGE CONDITIONS	21
6.	REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED	22
7.	REAGENT PREPARATION	22
8.	SAMPLE PREPARATION	23
9.	STANDARD PREPARATION	24
10.	INSTRUCTIONS	25
11.	RESULTS	27
12.	TECHNICAL ADVICES	28
13.	SAFETY RECOMMENDATIONS	28
14.	SPECIFICATIONS	28
	ANNEXE / ANNEX	34

1. INTRODUCTION

PAL TEST est un kit de type Immunocapture permettant le dosage de la **phosphatase alcaline** (PAL) dans le lait de vache et les fromages au lait de vache. Il a été développé à partir d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre la PAL du lait de vache, enzyme dont la mesure de l'activité est notamment utilisée pour la révélation des traitements thermiques appliqués aux produits laitiers. Du fait de la haute spécificité de l'anticorps utilisé, le test ne réagit pas avec les phosphatases alcalines exogènes (bactérienne, microbienne, fongique) et est en outre insensible à la présence d'inhibiteurs de la PAL.

L'utilisation du kit est automatisable et permet le dosage simultané de 42 échantillons en duplicate.

Ce test ne se substitue pas aux méthodes de référence en vigueur pour le contrôle officiel des traitements thermiques appliqués au lait et aux fromages.

2. DOMAINE D'APPLICATION

PAL TEST peut être utilisé sur les matrices suivantes :

- Lait de vache entiers et demi-écrémés
- Fromages au lait de vache de type :
 - Fromages à pâte persillée
 - Fromages à pâte pressée non cuite
 - Fromages à pâte dure
 - Fromages à pâte molle
 - Fromages à pâte lactique (type camembert ou chaource)

3. PRINCIPE

PAL TEST se présente sous la forme de plaques de type ELISA sensibilisées avec un anticorps monoclonal spécifique de la phosphatase alcaline du lait de vache. La technique de dosage est de type « immunocapture » en 2 étapes:

- la gamme d'étalonnage et les échantillons dilués (après extraction au butanol-1), sont distribués dans les puits de la microplaque.
- après lavage, la PAL capturée par l'anticorps est révélée par l'addition d'un substrat chromogène de l'enzyme (pNPP).

Après addition de la solution d'arrêt, les densités optiques sont lues à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Les résultats sont exprimés en équivalents milli-unité par litre (Eq.mU/l) pour les laits et en équivalents milli-unité par gramme (Eq.mU/g) pour les fromages (*).

() L'unité de référence pour le dosage de la phosphatase alcaline est le milli-unité par litre (mU/l) pour les laits et le milli-unité par gramme (mU/g) pour les fromages. Ces unités sont utilisées pour exprimer les résultats des analyses effectuées selon les deux méthodes de références décrites respectivement dans les normes ISO11816-1:2006 et ISO11816-2:2003.*

Du fait de son principe, le PALTEST évalue la quantité d'enzyme active capturée dans l'échantillon par l'anticorps monoclonal. Pour les tests de ce type, les résultats sont généralement exprimés en concentration en se basant sur une gamme d'étalonnage contenant des quantités connues de l'analyte purifié. En l'absence de matériaux de référence exprimant une concentration en phosphatase alcaline et devant l'impossibilité de disposer de cette enzyme purifiée, le PALTEST a été étalonné par rapport aux résultats donnés par la méthode de référence (ISO11816-1 :2006), et ses résultats exprimés en « équivalents » des résultats de cette méthode. Cependant, comme l'a montré une comparaison des résultats donnés par ces deux méthodes, basée sur l'analyse statistique du profil d'exactitude, la méthode PALTEST n'est pas substituable à la méthode de référence pour les dosages de PAL dans les fromages.

4. COMPOSITION DU KIT

Le kit est livré sous forme d'un coffret contenant :

- 6 barrettes de 16 puits (96 puits) sensibilisées avec un anticorps monoclonal spécifique de la PAL du lait de vache, emballées sous sachet aluminium hermétique refermable.
- 1 cadre de fixation pour 6 barrettes.
- 6 adhésifs pour barrettes 16 puits.
- 1 sachet contenant 42 pipettes de transfert à usage unique pour prélèvement des extraits.
- Réactif **R1** : Tampon de dilution pour la gamme et les échantillons - 2 flacons de 30 ml.
- Réactif **R2** : Solution mère étalon à 600 000 Eq.mU/l – un microtube de 0,5ml.
- Réactif **R3** : Tampon de lavage concentré 20 fois – 1 flacon de 100ml.
- Réactif **R4** : Tampon de dilution du substrat - 1 flacon de 32 ml.
- Substrat **pNPP** : 6 tablettes de 5mg sous emballage individuel hermétique – **A stocker à -20°C à réception.**
- Réactif **R5** : Solution d'arrêt 1,5M NaOH - 1 flacon de 20 ml.

5. CONDITIONS DE STOCKAGE

Conserver tous les réactifs du coffret à une température comprise entre +2°C et +8°C.

A réception, stocker le sachet contenant le substrat pNPP à -20°C.

Ne pas utiliser de réactifs au-delà de leur date d'expiration.

Ne pas exposer les réactifs, et en particulier le substrat, à une lumière vive pendant le stockage et les périodes d'incubation.

6. RÉACTIFS ET EQUIPEMENTS REQUIS

- Eau distillée ou déionisée
- 1-Butanol (n-butanol) : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, FW 74.12 (Code produit 360465 Sigma-Aldrich par exemple)
- Micropipettes de précision, 50 – 1000 μl et cônes jetables adaptés
- Micropipette multicanal 8 canaux (50-200 μl) et cônes adaptés
- Laveur de plaque manuel ou automatique
- Tubes à hémolyse en verre à usage unique 12ml (pour extraction des échantillons)
- Tubes de microtitration 1,2ml à usage unique $\varnothing 8,8\text{mm}$ x 45mm pour la dilution des échantillons
- Tubes à centrifuger fond conique 50 ml en plastique à usage unique avec bouchon
- Réservoir pour pipette multicanal
- Hachoir électrique type moulinette
- Homogénéiseur type Polytron®
- Agitateur orbital (type IKA-Vibrax®) avec plateau pour microplaque
- Bain-marie (42 - 45°C)
- Lecteur de microplaques avec filtre 405 nm
- Logiciel d'exploitation des données possédant un modèle de régression du type modèle logistique 4 paramètres $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$
- Centrifugeuse avec portoir pour tubes à hémolyse 12ml.
- Etuve régulée 35-38°C
- Couteaux
- Témoins de contrôle positif et négatif

7. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- **Laisser remonter tous les réactifs et le sachet aluminium contenant les barrettes à température ambiante avant utilisation**
- Homogénéiser chaque flacon manuellement par retournements successifs avant utilisation.
- Ne pas mélanger de réactifs provenant de lots différents.

Préparation du tampon de lavage 1X

Pour un essai utilisant les 6 barrettes (96 puits), procéder comme suit : dans un flacon propre, verser le flacon de 100 ml de tampon de lavage 20X (**R3**). Compléter avec 1900 ml d'eau distillée ou déionisée.

1. Homogénéiser sans faire mousser.
2. La solution peut-être conservée entre 2°C et 8°C pendant 15 jours.

Pour une utilisation fractionnée du test (barrette par barrette), préparer le volume de tampon de lavage nécessaire (50 ml de tampon de lavage 1X par barrette sont nécessaires + prévoir le volume mort nécessaire au système de lavage).

8. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de laits peuvent être conservés avant analyse par congélation à -20°C pendant 1 mois ou entre 2°C et 8°C pendant 48h maximum.

Les échantillons de fromage peuvent être conservés entre 2°C et 8°C. Ne pas congeler.

Laisser remonter les échantillons de lait et de fromage à température ambiante avant extraction.

8.1. Echantillons de laits

Agiter vigoureusement l'échantillon afin d'en assurer l'homogénéité puis :

1. Prélever 3ml de lait à l'aide d'une pipette automatique et les verser dans un tube en verre à usage unique. Ajouter 3ml de butanol-1. Boucher le tube puis agiter vigoureusement à la main 5 à 10 secondes. Vortexer pendant 30 secondes. Centrifuger pendant 30 minutes entre 2500g et 3500g.
2. Récupérer la phase aqueuse sous le disque de crème à l'aide d'une pipette de transfert (en expulsant doucement l'air tout en traversant la phase alcoolique et le disque de crème afin de ne pas obstruer l'embout de la pipette de transfert).
3. Diluer la phase aqueuse à l'aide du tampon de dilution R1. La dilution préconisée pour un extrait de lait cru est 1/200. Ce facteur de dilution doit être adapté en fonction du traitement thermique appliqué à l'échantillon. La dilution minimale possible de l'extrait est le 1/5.
Pour une dilution au 1/200, procéder en deux étapes comme suit :
Dilution 1/10: 50 µl extrait + 450 µl de tampon de dilution R1. Vortexer
Dilution 1/200: 25µl dilution 1/10 + 475 µl tampon R1. Vortexer.

8.2. Echantillons de fromages

1. Retirer la croûte ou la surface de l'échantillon d'essai avec un couteau propre. Prélever une quantité représentative du fromage et mouliner à l'aide d'un hachoir électrique. Laver soigneusement le bol avec de l'eau chaude savonneuse et sécher entre chaque échantillon.
2. Peser environ exactement 5g du broyat et les placer dans un tube à centrifuger à fond conique 50ml. Ajouter 2 fois le même poids d'eau désionisée, soit environ 10ml (noter les pesées). Placer le tube dans le bain-marie à 42-45°C pendant 15 minutes.
3. Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un Polytron® à 12000 rpm pendant 30 secondes. Rincer abondamment l'axe à l'eau chaude savonneuse et sécher entre chaque échantillon afin d'éviter toute contamination. Replacer les tubes au bain-marie à 42-45°C pendant 15 min. Mélanger soigneusement par retournement.

NB : Dans le cas des fromages à pâtes molles et lactiques, vérifier le pH de l'extrait. Il doit être supérieur à 6,0 pour assurer la validité du résultat.

4. Prélever 3ml du mélange et les verser dans un tube en verre à usage unique. Ajouter 3ml de butanol-1. Boucher le tube puis agiter vigoureusement à la main. Vortexer pendant 30 secondes. Centrifuger pendant 30 minutes à 2900 G.
5. Récupérer la phase aqueuse sous le disque de crème à l'aide d'une pipette de transfert (en expulsant doucement l'air tout en traversant la phase alcoolique et le disque de crème afin de ne pas obstruer l'embout de la pipette de transfert).
6. La dilution préconisée pour un extrait de fromage au lait cru est 1/200. Ce facteur de dilution doit être adapté en fonction du traitement thermique supposé appliqué à l'échantillon. La dilution minimale possible de l'extrait est le 1/5.
Pour une dilution au 1/200, procéder en deux étapes comme suit :
Dilution 1/10 : 50 µl extrait + 450 µl de tampon de dilution R1. Vortexer
Dilution 1/200 : 25µl dilution 1/10 + 475 µl tampon de dilution R1. Vortexer.

NB : Les phases aqueuses après extraction au butanol peuvent être conservées non diluées 10 jours maximum entre 2°C et 8°C avant analyse. Ceci peut notamment permettre de préparer un nombre suffisant d'extraits et de les analyser simultanément. Les dilutions devront être réalisées le jour de l'analyse.

9. PRÉPARATION DES STANDARDS

Une solution fille à 15 000 Eq.mU/l est préparée **extemporanément** en diluant la solution mère étalon **R2** au 1/40 dans le tampon de dilution **R1** comme suit.

Solution fille 15 000 Eq.mU/l : 50µl R2 + 1950µl R1

Les standards sont ensuite préparés extemporanément à partir de la solution fille à 15 000 Eq.mU/l de la façon suivante :

- STD1	5000 Eq.mU/l :	125µl (sol. fille 15 000 Eq.mU/l) + 250 µl R1
- STD2	3000 Eq.mU/l :	75 µl (sol. fille 15 000 Eq.mU/l) + 300 µl R1
- STD3	1000 Eq.mU/l :	25 µl (sol. fille 15 000 Eq.mU/l) + 350 µl R1
- STD4	500 Eq.mU/l :	50 µl (STD1) + 450 µl R1
- STD5	300 Eq.mU/l :	50 µl (STD2) + 450 µl R1
- STD6	100 Eq.mU/l :	50 µl (STD3) + 450 µl R1

Les dilutions des échantillons et des standards peuvent être réalisées directement dans les tubes de microtitration. Les volumes indiqués ici permettent de déposer chaque échantillon ou standard en duplicate.

10. MODE OPÉRATOIRE

Laisser remonter tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Il est recommandé d'analyser les échantillons, contrôles et standards en duplicate.

1. Préparer les réactifs, les échantillons, contrôles et standards comme décrit précédemment. Sortir le nombre de barrettes nécessaires du sachet aluminium et les fixer sur le cadre. Refermer soigneusement le sachet aluminium et le replacer à +2°C-+8°C. Veiller à ne pas toucher le dessous des barrettes.

2. Distribuer 300 µl de tampon de lavage (**R3 1X**) dans chaque puits. Vider le liquide de lavage par retournement ou par aspiration. Répéter l'opération 4 fois. Après le dernier lavage, éliminer les gouttelettes résiduelles en tapant la plaque retournée sur du papier absorbant propre et sec. *NB : Ne pas laisser sécher les puits entre deux étapes.*

3. Distribuer, au moyen d'une pipette multicanal, **100 µl/puits** des standards, contrôles et échantillons dans les puits correspondants. Recouvrir la plaque à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques. Incuber **1 heure** à température ambiante (18-25°C) sans agitation ou **30 minutes sous agitation douce**.

4. Pendant l'incubation, préparer extemporanément le volume de substrat nécessaire comme préconisé dans le tableau ci-dessous :

Nombre de barrettes utilisées	Nombre de tablettes pNPP	Volume de tampon R4 (ml)
1	1	5
2 à 5	2	10
6	3	15

Préchauffer le substrat en le plaçant environ 20 minutes dans l'étuve à 37°C.

5. Vider le liquide contenu dans les puits par retournement ou par aspiration. Répéter l'opération de lavage comme décrit au point 2.

6. Distribuer au moyen d'une pipette multicanal, **100 µl** de substrat dans chaque puits. Recouvrir à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques. Incuber **2 heures** à 35-38°C ou **entre 30 min et 1 heure** à 35-38°C si l'étape 3 a été réalisée sous agitation. Une coloration jaune se développe. Il est possible d'effectuer une lecture

7. Distribuer au moyen d'une pipette multicanal, **50 µl** de solution d'arrêt (**R5**) dans chaque puits. Recouvrir à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques.

8. Retirer l'adhésif et lire l'absorbance à 405nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

***NB :** Afin d'optimiser le temps d'incubation du substrat (obtention d'une DO max en correspondance avec la DO max du lecteur), il est possible d'effectuer une lecture de la plaque à 405 nm au cours de l'étape 6, avant l'ajout de la solution d'arrêt.*

Résumé du mode opératoire

Préparation des échantillons

LAITS



FROMAGES

Prélever un échantillon représentatif et **broyer****Peser** 5 g + 2 fois même poids d'eau déionisée

Bain-marie 45°C - ⏱ 15min

**Homogénéiser** au Polytron®

Bain-marie 45°C- ⏱ 15min



3ml dans tube verre + 3ml de butanol-1

**Agiter** vigoureusement manuellement + **vortexer** - ⏱ 30 secondes**Centrifuger** à 2900g - ⏱ 30min**Prélever** la phase aqueuse**Diluer** la phase aqueuse**Préparer la solution fille 15 000 Eq.mU/l à partir de la solution mère R2****Préparer les standards** à partir de la solution fille 15 000 Eq.mU/l

Analyse des échantillons

Laver 4 fois (4 x 300 µl)**Distribuer** 100µl/puits de chaque étalon et échantillon en duplicate**Incuber** 1 heure à température ambiante ou 30 min sous agitation**Préparer et préchauffer** le substrat 20 min à 37°C**Laver** 4 fois (4 x 300 µl)**Distribuer** 100µl/puits de substrat**Incuber** 2 heures à +37°C ou entre 30 min et 1 heure si précédente incubation réalisée sous agitation**Distribuer** 50µl/puits de solution d'arrêt**Lire** l'absorbance à 405nm**Interpréter** les résultats

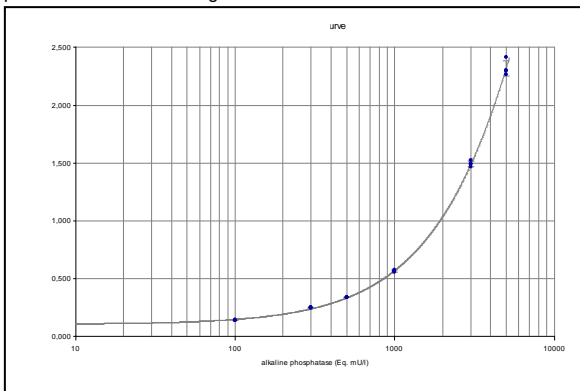
11. RÉSULTATS

La courbe d'étalonnage est obtenue en portant en ordonnées, les densités optiques (DO) lues pour chaque standard et en abscisse leurs valeurs en Eq.mU/l (échelle logarithmique).

La courbe d'étalonnage peut être générée en utilisant idéalement un modèle logistique 4 paramètres ($Y = (A-D)/(1+(X/C)^B)+D$) au moyen d'un logiciel d'exploitation des données possédant cette fonction.

En l'absence de ce type de logiciel ou de ce modèle de régression, il est également possible d'utiliser les fonctions graphiques d'un tableur de type Excel pour calculer les résultats en utilisant une régression polynômiale d'ordre 4. *Un modèle type est disponible sur demande auprès d'IDBiotech.*

Un exemple de courbe d'étalonnage obtenue est donné ci-dessous :



Les valeurs en Eq.mU/l ou Eq.mU/g des échantillons sont ensuite calculées comme suit :

- **Echantillons de lait :**

Valeur en Eq.mU/l = valeur en Eq.mU/l de l'échantillon x facteur de dilution

- **Echantillons de fromage :**

Valeur en Eq.mU/g =
$$\frac{\text{Valeur en Eq.mU/l de l'échantillon} \times (\text{masse d'eau en g})}{(\text{masse de fromage en g} \times 1000)}$$

12. CONSEILS TECHNIQUES

Des changements au niveau de l'opérateur, de la technique de pipetage ou de lavage, des temps d'incubation et/ou de la température peuvent engendrer des variations dans les résultats.

Pour l'obtention de résultats précis et reproductibles, la distribution des étalons et échantillons doit être soignée. Utiliser uniquement des pipettes de précision ayant été vérifiées métrologiquement et dont la vérification est encore valide. De la même façon, utiliser un lecteur de plaques vérifié métrologiquement (une attention toute particulière doit être portée à la vérification de sa linéarité et la détermination de sa DO max à la longueur d'onde de travail).

Eviter de faire mousser les solutions lors des dilutions.

Pour éviter les contaminations croisées, changer les cônes de pipettes entre chaque échantillon, étalons et réactifs.

Utiliser des flacons et des réservoirs individuels référencés pour chaque réactif.

Les étapes de lavage sont très importantes, respecter le nombre de cycles de lavage.

Un chronométrage équivalent entre les étapes de distribution des réactifs et de lavage dans chaque puits est impératif.

La solution d'arrêt doit être distribuée dans les puits selon le même ordre et avec le même timing que le substrat.

13. CONSIGNES DE SECURITE

Veiller à respecter les consignes d'hygiène et de sécurité relatives à la manipulation des réactifs et notamment du solvant organique utilisé pour l'extraction (travail sous hotte). Les locaux de travail doivent être bien ventilés. Eviter la présence de toute source d'ignition ou de chaleur (flammes, étincelles, rayons solaires...). Eviter l'inhalation de vapeurs ou d'aérosols et porter des appareils de protection adaptés afin d'éviter tout contact cutané ou oculaire.

14. CARACTÉRISTIQUES TECHNIQUES

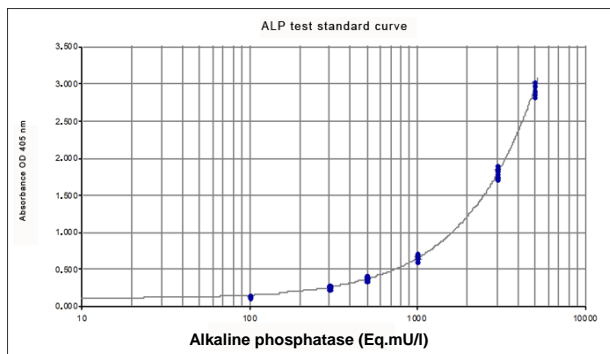
Les caractéristiques techniques du PAL test ont été déterminées selon les directions principales du document « Validation des procédures analytiques: texte et méthodologie Q2 (R1) Novembre 2005 » publié par l'ICH (« International Conference on Harmonisation »).

14.1. Linéarité

Deux modèles de régression ont été étudiés.

- **Régression non linéaire à 4 paramètres: $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$**

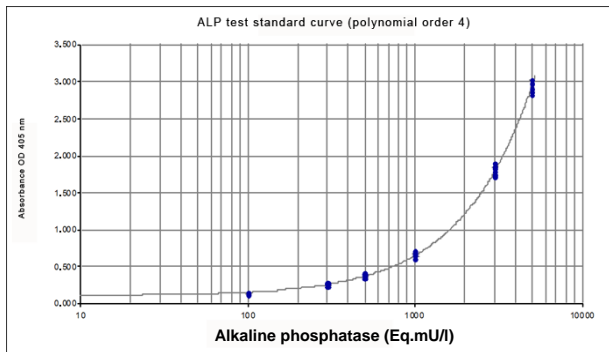
	Absorbance 405 nm (OD)	OD/ODmax (%)	Mean of calculated concentration (Eq. mU/l)	CV (%)
STD1	3.029 2.818 3.030 2.891 2.982 3.035 2.900 2.971 2.863 2.897	-	5003.9	2.7
STD2	1.893 1.741 1.854 1.747 1.788 1.835 1.737 1.815 1.746 1.717	61	2990.1	3.5
STD3	0.705 0.645 0.680 0.650 0.661 0.673 0.654 0.667 0.649 0.611	22	1014.6	4.3
STD4	0.402 0.369 0.394 0.369 0.377 0.386 0.369 0.384 0.368 0.340	13	506.2	6.2
STD5	0.285 0.260 0.275 0.260 0.267 0.275 0.262 0.270 0.262 0.235	9	303.6	8.1
STD6	0.154 0.147 0.152 0.148 0.149 0.150 0.147 0.158 0.147 0.147	5	86.6	8.3



$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$				
A	B	C	D	R ²
0.107	1.04	1.37E+05	91.5	0.998

- Régression polynomiale d'ordre 4: $Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$

	Absorbance 405 nm (OD)	OD/ODmax %	Mean of calculated concentration (Eq. mU/l)	CV (%)
STD1	3.029 2.818 3.030 2.891 2.982 3.035 2.900 2.971 2.863 2.897	-	5000.3	2.7
STD2	1.893 1.741 1.854 1.747 1.788 1.835 1.737 1.815 1.746 1.717	61	2999.9	3.4
STD3	0.705 0.645 0.680 0.650 0.661 0.673 0.654 0.667 0.649 0.611	22	1000.5	4.4
STD4	0.402 0.369 0.394 0.369 0.377 0.386 0.369 0.384 0.368 0.340	13	497.5	6.1
STD5	0.285 0.260 0.275 0.260 0.267 0.275 0.262 0.270 0.262 0.235	9	303.2	7.7
STD6	0.154 0.147 0.152 0.148 0.149 0.150 0.147 0.158 0.147 0.147	5	102.9	6.3



$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$					
A	B	C	D	E	R ²
0.0903	0.000581	-1.76E-08	5.70E-12	-5.24E-16	0.998

Le modèle non linéaire à 4 paramètres $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$ ainsi que la régression polynomial d'ordre 4 $Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$ décrivent la relation « concentration / DO » optimale avec un coefficient de corrélation R^2 supérieur ou égal à 0,99.

Le modèle de régression non linéaire à 4 paramètres a été utilisé pour déterminer les spécifications techniques présentées dans le reste de ce document.

14.2. Limite de detection – Limite de quantification

La LOD (Limite de Détection) a été déterminée par interpolation de la moyenne des blancs (36 DO) + 3 écart-types. Soit une LOD de **50 Eq.mU/l**.

La LOQ (Limite de Quantification) a été déterminée par interpolation de la moyenne des blancs (36 DO) + 10 écart-types. Soit une LOQ de **250 Eq.mU/l**.

- **Application au lait**

Le facteur **minimum** de dilution (**1/5**) des échantillons doit être pris en compte. Ainsi la LOD pour **les échantillons de lait** est **250 Eq.mU/l** et la LOQ est **1250 Eq.mU/l (soit environ 0.1% de lait cru dans du lait pasteurisé)**.

- **Application au fromage**

L'extraction de l'échantillon (poids du fromage et volume de tampon) doit être prise en compte.

Donc la LOD pour les échantillons de fromage est **2.5 Eq.mU/g** et la LOQ est **12.5 Eq.mU/g**.

14.3. Répétabilité – Reproductibilité

Lait entier - Données:

PAL (Eq.mU/l)	Répétabilité (CV%)	Reproductibilité (CV%)
2454	2.0	13.0
837	3.8	12.3
456	5.8	15.6

Fromage à pâte molle - Données:

PAL (Eq.mU/g)	Répétabilité (CV%)	Reproductibilité (CV%)
1866	5.3	18.0
1080	5.6	20.0
633	5.8	21.0

Fromage à pâte lactique - Données:

PAL (Eq.mU/g)	Répétabilité (CV%)	Reproductibilité (CV%)
1326	5.5	11.0
278	3.2	23.0

Fromage à pâte persillée - Données:

PAL (Eq.mU/g)	Répétabilité (CV%)	Reproductibilité (CV%)
1655	2.8	7.5
159	2.2	11.9

Fromage à pâte pressée non cuite - Données:

PAL (Eq.mU/g)	Répétabilité (CV%)	Reproductibilité (CV%)
5508	3.1	9.9
44	10.1	12.4

14.4. Précision (lait entier)

Concentration théorique (Eq.mU/l)	Concentration mesurée (Eq.mU/l)	Concordance (%)
-	659 805	-
494 854	464 916	94
329 903	310 698	94
164 951	150 442	91
65 981	57 054	86

14.5. Spécificité

L'anticorps monoclonal utilisé dans ce test n'a montré aucune réaction croisée avec les phosphatases alcalines suivantes :

- Phosphatase alcaline intestinale bovine (SIGMA P6774 – FLUKA 79390)
- Phosphatase alcaline fongique (penicillium roqueforti)
- Phosphatase alcaline *E.coli* (SIGMA P4377)
- Phosphatase alcaline du lait de chèvre et du lait de brebis

Comparaison avec la méthode fluorimétrique

Cette étude a été organisée et fondée par le CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière). L'objectif était de comparer les résultats obtenus pour des laits et des fromages avec le PAL TEST avec ceux obtenus en utilisant les méthodes fluorimétriques des normes ISO11816-1 et ISO11816-2 (dans une version en cours de révision). La méthode statistique pour l'interprétation utilisée était la procédure avec un profil de précision conformément à la norme NF V03-110. Les résultats de cette étude sont disponibles auprès du CNIEL.

1. INTRODUCTION

The ALP Test is an immunocapture assay used for measuring the levels of alkaline phosphatase (ALP) in cow milk and cow milk cheese. It is based on a monoclonal antibody specific to the ALP of cow milk which allows the measurement of the ALP enzymatic activity as an indicator of the effects of heat treatment applied to milk & dairy products. Since the antibody is only specific to the ALP of cow milk, this assay does not detect exogenous alkaline phosphatases of bacterial, microbial or fungal origin. Furthermore the assay is not sensitive to the presence of ALP inhibitors.

This assay can run 42 samples in duplicate, simultaneously, and can also be automated.

This test cannot replace the current European standard methods used for the official testing of heat treated dairy products.

2. FIELD OF APPLICATION

The ALP TEST can be used for the following products:

- Whole or skimmed cow milk
- Cow milk cheeses of the following types:
 - Blue-veined cheeses
 - Uncooked hard cheeses
 - Hard cooked cheeses
 - Soft-ripened cheeses
 - Fresh cheeses

3. ASSAY PRINCIPLE

The ALP TEST is presented in the format of an ELISA plate coated with a monoclonal antibody specific to the alkaline phosphatase found in cow milk. The assay technique is based on a 2-step immunocapture:

- After extraction with butanol-1, the calibration standards and the diluted samples are distributed in the wells of the microplate.
- After rinsing, the ALP captured by the antibodies is detected by the addition of a chromogenic substrate specific of the ALP (pNPP).

After addition of the stop solution, the optical densities are measured at 405 nm with a microplate reader.

The results are expressed in equivalent-milliunit per litre (Eq.mU/l) for milk and in equivalent-milliunit per gram (Eq.mU/g) for cheese (*).

() The standard unit for the alkaline phosphatase assay is (the) milliunit per litre (mU/l) for milk and (the) milliunit per gram (mU/g) for cheese. These units are routinely applied when the ALP analyses are carried out following the two standard methods described in ISO 11816-1:2006 and ISO 11816-2:2003, respectively.*

The ALP TEST evaluates the amount of active enzyme captured by the monoclonal antibody. For these types of tests, the results are usually expressed in terms of concentration, based on a calibration range containing known quantities of the purified analyte. In the absence of reference material expressing known concentrations of the alkaline phosphatase and since it is not possible to obtain the purified enzyme, the ALP TEST has been calibrated in relation to the results obtained using the standardised method (ISO11816-1 :2006), and then the results are expressed as “equivalent” to the results obtained with this method. However, as it has been shown during a comparative study with both methods, based on statistical analysis of the accuracy profile, the ALP TEST cannot be substituted to the standard method for determining ALP in cheeses.

4. KIT CONTENT

The kit is delivered in a box containing:

- 6 16–wells strips (totally 96 wells) coated with a monoclonal antibody specific to cow milk ALP, wrapped in re-sealable aluminium pouches.
- 1 strip holder.
- 6 adhesive covers for 16-well strips.
- 1 bag containing 40 disposable transfer pipettes for pipeting sample extracts.
- Reagent **R1**: Dilution buffer for the calibration range and for the samples - 2 x 30 ml vials.
- Reagent **R2**: Standard solution at 600,000 Eq.mU/l – 1 x 0.5ml, microtube
- Reagent **R3**: Wash buffer, 20-fold concentrated – 1 x100 ml vial.
- Reagent **R4**: Substrate dilution buffer - 1 x 32 ml vial.
- pNPP substrate: 6 x 5mg tablets in individual hermetically sealed pouches – **to be stored at -20°C upon receipt.**
- Reagent **R5**: Stop solution, 1.5M NaOH - 1 x 20 ml vial.

5. STORAGE CONDITIONS

Store all reagents but the pNPP substrate at a temperature ranging from +2°C to +8°C.

Upon receipt, store the pouches containing the pNPP substrate at -20°C.

Do not use the reagents after their expiry date.

Prevent all the reagents, especially the substrate, from light exposure during storage and during assay incubation steps.

6. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED

- Distilled or deionised water
- 1-butanol (n-butanol): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, FW 74.12 (e.g. product code 360465 Sigma-Aldrich)
- Precision micropipettes (50 – 1000 μl) with corresponding disposable tips
- 8-channel micropipette with variable volume (50-200 μl) and corresponding disposable tips
- 300 μl mono or multichannel dispenser or manual or automatic plate washer
- 12 ml disposable glass haemolysis tubes (for sample extraction)
- Disposable 1.2ml \varnothing 8.8mm x 45mm microtitration tubes for sample dilution
- Disposable plastic 50 ml conical bottom centrifuge tubes with stoppers
- Reservoir (for multichannel pipette)
- Electric mincer
- Polytron®-type homogeniser
- Orbital shaker (type IKA-Vibrax®) with tray for microplate
- Water bath (42 - 45°C)
- Microplate reader with 405 nm filter
- Data treatment software including a 4 parameter logistics regression model $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$
- Centrifuge with 12 ml haemolysis tube holder.
- Incubator set to 35-38°C
- Scalpels
- Positive and negative control samples

7. REAGENT PREPARATION

- **Before use bring all reagents and the aluminium pouch containing the plates to room temperature**
- Homogenise each vial manually by turning upside down several times before use.
- Do not mix reagents from different lots.

Preparation of 1X wash buffer

For an assay using the 6 strips (96 wells), proceed as follows:

Into a clean new vial, mix the 100 ml of 20X wash buffer (R3) with 1900 ml of distilled or deionised water.

1. Homogenise without generating foam
2. The solution can be stored at +2°C/+8°C during 15 days

If the kit is used strip per strip, prepare the necessary volume of wash buffer (50 ml 1X wash buffer per strip is required, plus the expected dead volume required for the washing system).

8. SAMPLE PREPARATION

Milk samples can be kept frozen at -20°C for 1 month before analysis or at $+2^{\circ}\text{C}/+8^{\circ}\text{C}$ for a maximum of 48h.

Cheese samples can be stored at $+2^{\circ}\text{C}/+8^{\circ}\text{C}$. Do not freeze.

Bring milk and cheese samples to room temperature before extraction.

8.1. Milk samples

Shake the sample vigorously to ensure homogeneity, then:

1. Pipet 3ml milk using an automatic pipette and pour into a disposable glass tube. Add 3ml butanol-1. Put a stopper on the tube then shake vigorously by hand for 5 to 10 seconds. Vortex for 30 seconds. Centrifuge for 30 minutes between 2500g and 3500g.
2. Collect the aqueous phase under the fat layer with a transfer pipette (expelling the air slowly while crossing the alcohol phase and the fat layer so as not to clog the end of the transfer pipette).
3. The recommended dilution for a milk extract is 1/200. This dilution factor must be adapted in relation to the thermal treatment applied to the sample. The minimum possible dilution of the extract is 1/5.
For a dilution of 1/200, proceed in two steps as follows:
Dilution 1/10: 50 μl extract + 450 μl dilution buffer R1. Vortex
Dilution 1/200: 25 μl dilution 1/10 + 475 μl dilution buffer R1. Vortex.

8.2. Cheese samples

1. Remove the crust or the surface of the cheese sample with a clean scalpel. Take a representative amount of the cheese and homogenise it in a grinder. Wash the bowl carefully with hot water containing detergent and dry it between each sample.
2. Weigh about 5g precisely of the homogenate and place it in a 50ml centrifuge tube with a conical bottom. Add twice the same weight of deionised water. Place the tube in a water bath at $42-45^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes.
3. Homogenise the sample in a Polytron[®] at 12000 rpm for 30 seconds. Rinse the blade thoroughly with hot water containing some detergent and dry it between each sample in order to avoid any cross-contamination. Return the tubes back to the water bath at $42-45^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Mix thoroughly by inversion.

NB: in the case of fresh curd cheeses, check the pH of the extract. This must be higher than 6.0 to ensure the validity of the results.

4. Transfer 3ml of the mixture into a disposable glass tube. Add 3ml butanol-1. Put a stopper on the tube then shake vigorously by hand. Vortex for 30 seconds. Centrifuge for 30 minutes at 2900 G.
5. Collect the aqueous phase under the emulsion layer with a transfer pipette (expelling the air slowly while crossing the butanol phase and the emulsion layer so as not to clog the end of the transfer pipette).
6. The recommended dilution for an extract of cheese made from crude milk is 1/200. This dilution factor must be adapted in relation to the thermal treatment applied to the sample. The minimum possible dilution of the extract is 1/5.
For a dilution of 1/200, proceed in two steps as follows:
Dilution 1/10: 50 µl extract + 450 µl dilution buffer R1. Vortex
Dilution 1/200: 25µl dilution 1/10 + 475 µl buffer R1. Vortex.

NB: *The aqueous phases after extraction with butanol can be kept undiluted at +2°C/+8°C for a maximum of 10 days before analysis. This can notably allow a sufficient number of extracts to be prepared and analysed simultaneously. The dilutions must be carried out on the day of analysis.*

9. STANDARD PREPARATION

A working solution at 15,000 Eq.mU/l is prepared extemporaneously by diluting the stock solution R2 to 1/40 in the dilution buffer R1 as follows:

Working sol. 15,000 Eq.mU/l 50µl R2 + 1950µl R1

The standard solutions are then prepared extemporaneously from the working solution at 15,000 Eq.mU/l as follows:

- STD1	5000 Eq.mU/l:	125µl (15,000 Eq.mU/l) + 250 µl R1
- STD2	3000 Eq.mU/l:	75 µl (15,000 Eq.mU/l) + 300 µl R1
- STD3	1000 Eq.mU/l:	25 µl (15,000 Eq.mU/l) + 350 µl R1
- STD4	500 Eq.mU/l:	50 µl (STD1) + 450 µl R1
- STD5	300 Eq.mU/l:	50 µl (STD2) + 450 µl R1
- STD6	100 Eq.mU/l:	50 µl (STD3) + 450 µl R1

Sample and standard dilutions can be done directly in microtitration tubes. The volumes indicated here allow for duplicates of each sample or standard solution.

10. INSTRUCTIONS

Bring all reagents to room temperature before use. It is recommended that all samples, controls and standards are analysed in duplicate.

1. Prepare the reagents, samples, controls and standards as described previously. Remove the required number of strips from the aluminium pouch and place them on the strip holder. Carefully reseal the aluminium pouch and return it at +2°C/+8°C. Be careful not to touch the underneath of the plates.
2. Distribute 300 µl of wash buffer (**R3 1X**) into each well. Then eliminate the washing liquid by turning the plate upside down or by aspiration using a pipet. Repeat the operation 4 times. After the final wash, eliminate any residual droplets by tapping the overturned plate onto clean and dry absorbent paper. *NB: Do not let the wells drying out between consecutive steps.*
3. Distribute, using a multichannel pipette, **100 µl/well** of standards, controls and samples in the corresponding wells. Cover the plate with an adhesive cover and shake gently for a few seconds on a plate shaker. Incubate for **1 hour** at room temperature (18-25°C) or **30 minutes under gentle shaking**.
4. During the incubation, prepare extemporaneously the volume of substrate necessary according to the table below:

Number of strips used	Number of pNPP tablets	Volume of R4 buffer (ml)
1	1	5
2 to 5	2	10
6	3	15

Preheat the substrate by placing it in the incubator at 37°C for about 20 minutes.

5. Empty the liquid from the wells by turning the plate upside down or by aspiration. Repeat the washing operation as described in step 2.
6. Using a multichannel pipette, distribute 100 µl of substrate into each well. Cover the plate with the adhesive cover and shake gently for a few seconds on the plate shaker. Incubate for 2 hours at 35-38°C or 1 hour at 35-38°C if step 3 was carried out with agitation. A yellow colour develops.
7. Using a multichannel pipette, distribute 50 µl of stop solution (R5) into each well. Cover with the adhesive cover and shake gently for a few seconds on the plate shaker.
8. Remove adhesive cover and read the absorbance at 405nm using a microplate reader.

NB : in order to optimize the incubation time of substrate (to obtain OD max corresponding to OD max of the microplate reader), it's possible to read the absorbance at 405nm during step 6, before the addition of stop solution.

Instructions summary

Sample preparation

MILK

↓

CHEESE

Take a representative sample and

grind

↓

Weigh 5 g + twice weight of deionised water

↓

Water bath 45°C - \approx 15min

↓

Homogenise in Polytron®

↓

Water bath 45°C- \approx 15min

↓

3ml in glass tube + 3ml butanol-1

↓

Shake vigorously by hand + **vortex** - \approx 30 seconds

↓

Centrifuge at 2900g - \approx 30min

↓

Take aqueous phase

↓

Dilute aqueous phase

↓

Prepare working solution 15,000 Eq.mU/l based on stock solution R2

Prepare standards based on working solution 15,000 Eq.mU/l

Sample analysis

Wash 4 times (4 x 300 μ l)

↓

Distribute 100 μ l/well of each calibration and sample in duplicate

↓

Incubate 1 hour at room temperature or 30 min under agitation

↓

Prepare and preheat substrate 20 min at 37°C

↓

Wash 4 times (4 x 300 μ l)

↓

Distribute 100 μ l/well of substrate

↓

Incubate 2 hours at +37°C or 30 min to 1 hour if previous incubation carried out with agitation

↓

Distribute 50 μ l/well of stop solution

↓

Read absorbance at 405nm

↓

Interpret results

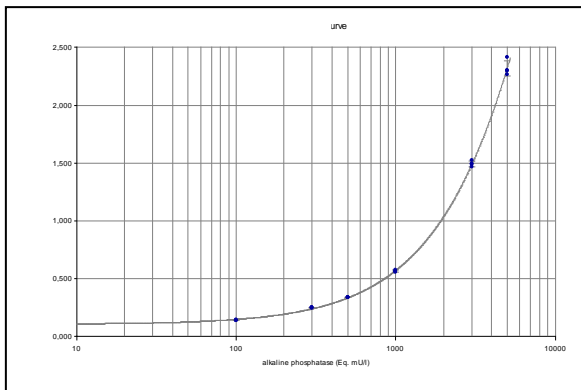
11. RESULTS

The calibration curve is obtained by plotting on the Y-axis the optical density (OD) read for each standard and on the X-axis their values in Eq.mU/l (logarithmic scale).

The calibration curve can be generated by using ideally a logistic 4 parameter model ($Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$) using appropriate software to analyse the data.

In the absence of this type of software or this regression model, it is also possible to use the graphic functions of the Excel software or similar software to calculate the results using polynomial regression of the order of 4. *A typical model is available on request from IDBiotech.*

An example of the calibration curve is given below:



Values in Eq.mU/l or Eq.mU/g of samples are then calculated as follows:

- **Milk samples:**

Value in Eq.mU/l = value in Eq.mU/l sample x dilution factor

- **Cheese samples:**

Value in Eq.mU/g =
$$\frac{\text{Value in Eq.mU/l sample} \times (\text{weight of water in g})}{(\text{weight of cheese in g} \times 1000)}$$

12. TECHNICAL SPECIFICATIONS

Any change at the level of the operator, pipette technique or washing, time of incubation and/or temperature variations may lead to variations in the final results.

To obtain precise and reproducible results, the calibration and sample distribution must be done carefully. Only use precision pipettes that have been metrologically checked and for which the verification is still valid.

Avoid creating bubbles in the solutions during dilutions.

To avoid cross-contaminations, change the pipette tips between each sample, calibration and reagent.

Use individual flasks and reservoirs labelled for each reagent.

Respect the number of washing cycles as the washing stages are very important.

It is imperative to have equivalent timing between the steps of reagent distribution and washing in each well.

The stop solution must be distributed in the wells in the same order and with the same timing as the substrate.

13. SAFETY RECOMMENDATIONS

Be careful to respect all hygiene and safety recommendations concerning the handling of reagents and notably the organic solvent used for extraction (work in fume cupboard). The work premises must be well ventilated. Avoid the presence of ignition or heat sources (flames, sparks, solar radiation, etc.). Avoid inhaling aerosol vapours and wear appropriate protective clothing to avoid all contact with skin and eyes.

14. TECHNICAL SPECIFICATIONS

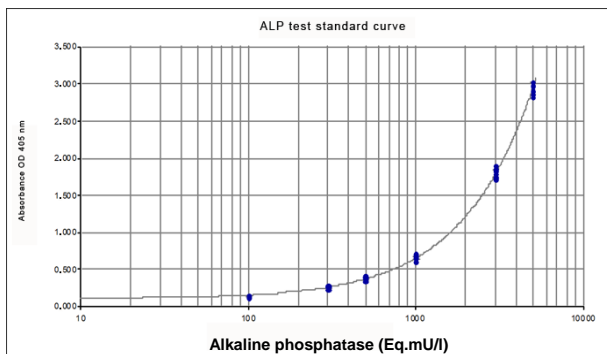
The technical specifications of the ALP Test were determined following the main directions of the document "Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) November 2005" published by the ICH (International Conference on Harmonization).

14.1. Linearity

Two regression models were studied.

- **4 parameter logistic model $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$**
-

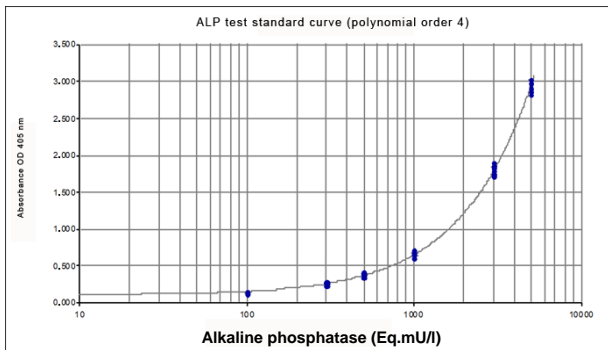
	Absorbance 405 nm (OD)	OD/ODmax (%)	Mean of calculated concentration (Eq. mU/l)	CV (%)
STD1	3.029 2.818 3.030 2.891 2.982 3.035 2.900 2.971 2.863 2.897	-	5003.9	2.7
STD2	1.893 1.741 1.854 1.747 1.788 1.835 1.737 1.815 1.746 1.717	61	2990.1	3.5
STD3	0.705 0.645 0.680 0.650 0.661 0.673 0.654 0.667 0.649 0.611	22	1014.6	4.3
STD4	0.402 0.369 0.394 0.369 0.377 0.386 0.369 0.384 0.368 0.340	13	506.2	6.2
STD5	0.285 0.260 0.275 0.260 0.267 0.275 0.262 0.270 0.262 0.235	9	303.6	8.1
STD6	0.154 0.147 0.152 0.148 0.149 0.150 0.147 0.158 0.147 0.147	5	86.6	8.3



$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$				
A	B	C	D	R ²
0.107	1.04	1.37E+05	91.5	0.998

- Polynomial regression of the order of 4: $Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$

	Absorbance 405 nm (OD)	OD/ODmax %	Mean of calculated concentration (Eq. mU/l)	CV (%)
STD1	3.029 2.818 3.030 2.891 2.982 3.035 2.900 2.971 2.863 2.897	-	5000.3	2.7
STD2	1.893 1.741 1.854 1.747 1.788 1.835 1.737 1.815 1.746 1.717	61	2999.9	3.4
STD3	0.705 0.645 0.680 0.650 0.661 0.673 0.654 0.667 0.649 0.611	22	1000.5	4.4
STD4	0.402 0.369 0.394 0.369 0.377 0.386 0.369 0.384 0.368 0.340	13	497.5	6.1
STD5	0.285 0.260 0.275 0.260 0.267 0.275 0.262 0.270 0.262 0.235	9	303.2	7.7
STD6	0.154 0.147 0.152 0.148 0.149 0.150 0.147 0.158 0.147 0.147	5	102.9	6.3



$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$					
A	B	C	D	E	R ²
0.0903	0.000581	-1.76E-08	5.70E-12	-5.24E-16	0.998

4 parameter logistic model $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$ as well as the order 4 polynomial regression $Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$ describe the optimal “concentration / OD” relation with a correlation coefficient R^2 superior or equal to 0.99.

The 4 parameter logistic model was used to determine the technical specifications presented in the rest of this document.

14 .2. Detection limit – Quantitation limit

The **LOD** (Limit of Detection) was determined by interpolating the mean based on 36 Optical Densities plus 3 standard deviations. It is **50 Eq.mU/l**.

The **LOQ** (Limit of Quantification) was determined by interpolating the mean based on 36 Optical Densities plus 10 standard deviations.

It is **250 Eq.mU/l**.

- **Application to milk testing**

The **minimum** dilution factor (**1/5**) of samples must be taken into account. Thus the LOD for **milk samples** is **250 Eq.mU/l** and the LOQ is **1250 Eq.mU/l** (i.e. **about 0.1% of raw milk in pasteurised milk**).

- **Application to cheese testing**

The extraction of the sample (weight of cheese and volume of buffer) must be taken into account, as well as the minimum dilution factor (**1/5**) of samples. Thus the LOD for **cheese samples** is **2.5 Eq.mU/g** and the LOQ is **12.5 Eq. mU/g**.

14.3. Repeatability – Intermediate reliability

Whole milk - Study data:

ALP (Eq.mU/l)	Intra-assay repeatability (CV%)	Inter-assay intermediate reliability (CV%)
2454	2.0	13.0
837	3.8	12.3
456	5.8	15.6

Soft cheese - Study data:

ALP (Eq.mU/g)	Intra-assay repeatability (CV%)	Inter-assay intermediate reliability (CV%)
1866	5.3	18.0
1080	5.6	20.0
633	5.8	21.0

Fresh curd cheese - Study data:

ALP (Eq.mU/g)	Intra-assay repeatability (CV%)	Inter-assay intermediate reliability (CV%)
1326	5.5	11.0
278	3.2	23.0

Blue-veined cheese - Study data:

ALP (Eq.mU/g)	Intra-assay repeatability (CV%)	Inter-assay intermediate reliability (CV%)
1655	2.8	7.5
159	2.2	11.9

Uncooked pressed cheese - Study data:

ALP (Eq.mU/g)	Intra-assay repeatability (CV%)	Inter-assay intermediate reliability (CV%)
5508	3.1	9.9
44	10.1	12.4

14.4. Precision (Whole milk)

Theoretical concentration (Eq.mU/l)	Measured concentration (Eq.mU/l)	Recovery (%)
-	659 805	-
494 854	464 916	94
329 903	310 698	94
164 951	150 442	91
65 981	57 054	86

14.5. Specificity

The monoclonal antibody used in this ALP Test has not shown any cross reactivity with the following alkaline phosphatases:

- Bovine intestinal alkaline phosphatase (SIGMA P6774 – FLUKA 79390)
- Fungal alkaline phosphatase (penicillium roqueforti)
- *E.coli* alkaline phosphatase (SIGMA P4377)
- Alkaline phosphatase from goat and sheep milk

Comparison with fluorometric method

This study has been organised and funded by the “Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière” (CNIEL).

The objective consisted of comparing the results obtained for milk and cheese by the ALP TEST with those obtained using standard fluorometric methods ISO 11816-1 and ISO 11816-2 (in a version under revision). The statistical method of interpretation used was the procedure with precision profile in accordance with standard NF V03-110. The results of this study are available from the CNIEL.

ANNEXE / ANNEX

Schéma de dépôt / Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

IDBiotech

*ImmunoDiffusion Biotechnologies SARL
Rue Marie Curie
63500 Issoire – FRANCE*

Tel: +33 (0)4 73 54 95 01

Fax: +33 (0)4 73 54 43 94

Web : www.idbiotech.com

e-mail : contact@idbiotech.com