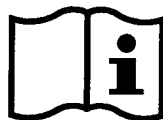


Product information



User's Manual



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
info@listarfish.it
www.listarfish.it

Treponema pallidum (Syphilis) IgM ELISA



DE4267



96 wells

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	KIT COMPONENTS	5
5	SPECIMEN	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	RESULTS	8
8	QUALITY CONTROL	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF USE	10
11	LEGAL ASPECTS	11

1	INTRODUZIONE	21
2	PRINCIPIO DEL TEST	21
3	PRECAUZIONI	21
4	COMPONENTI DEL KIT	22
5	CAMPIONI	23
6	ATTUAZIONE DEL TEST	23
7	RISULTATI	25
8	CONTROLLO QUALITÀ	25
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	26
10	LIMITAZIONI DEL TEST	26
11	ASPETTI LEGALI	27

12	REFERENCES / LITERATURE	36
----	-------------------------------	----

	SHORT INSTRUCTIONS FOR USE	37
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	40

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM Enzyme Immunoassay Kit** provides materials for the **qualitative** and **semiquantitative** determination of IgM-class antibodies to Treponema pallidum in human serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma). **This assay is intended for in vitro diagnostic use only.**

1.2 Summary and Explanation

Spirochetes are motile bacteria with a periplasmic axial filament. All pathogenic species belong to the family Treponemataceae, which includes the three genera: Treponema, Borrelia, and Leptospira. The Treponema are motile bacteria, 5-15 µm in length and 0.2 µm in width, containing about 10 flexible, undulating, spiral shaped rods. Treponema pallidum, the causative agent of Syphilis, is transmitted by direct contact, usually through sexual intercourse. Syphilis along with Gonorrhoea, Chancroid and Lymphogranuloma venereum, designated as a venereal disease, or VD, is an acute and chronic infectious disease. After an incubation period of 12-30 days, the first symptoms to appear are chancres, soon followed by syphilitic ulcers which then spontaneously disappear in a few weeks. During this first stage (primary syphilis) the Treponema pallidum propagates in related lymph nodes to be distributed to the whole body stream. Three further stages of disease follow which are classified as secondary, tertiary, and quaternary syphilis. Treatment with antibiotics at the earliest disease stage and prophylactic measures are ways to prevent epidemics. For this purpose, antenatal and donor blood screenings are mandatory in most of countries around the world.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM ELISA Kit** is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) This ELISA is using a RF-Sorbent. The Rheumatoid factor (RF) is a special autoantibody form. These are autoantibodies, which are directed against the Fc fragment of human IgG. The RF autoantibodies are mostly class IgM, but may also be class IgA, IgG or IgE. Rheumatoid factors are associated with rheumatoid arthritis. But they can also be detectable in other diseases (e.g. tuberculosis, salmonellosis, syphilis, etc.) and even in healthy individuals. In about 5% of all healthy people, elevated RF values can be found; the titer increases with increasing age. The use of anti-human IgG antibodies in the RF-sorbent prevents false positive or false negative results. Patient samples are diluted with Sample Diluent and additionally incubated with IgG-RF-Sorbent, Microtiter wells as a solid phase are coated with Treponema pallidum antigen. **Pretreated patient** specimens and **ready-for-use controls** are pipetted into these wells. During incubation Treponema pallidum-specific antibodies of positive specimens and controls are bound to the immobilized antigens.

After a washing step to remove unbound sample and control material horseradish peroxidase conjugated anti-human IgM antibodies are dispensed into the wells. During a second incubation this anti-IgM conjugate binds specifically to IgM antibodies resulting in the formation of enzyme-linked immune complexes.

After a second washing step to remove unbound conjugate the immune complexes formed (in case of positive results) are detected by incubation with TMB substrate and development of a blue color. The blue color turns into yellow by stopping the enzymatic indicator reaction with sulfuric acid.

The intensity of this color is directly proportional to the amount of Treponema pallidum-specific IgM antibody in the patient specimen. Optical density at 450 nm is read using an ELISA microtiter plate reader.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.2 mol/L H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 KIT COMPONENTS

4.1 Contents of the Kit

1. **SORB MT** Microtiterwells, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with Treponema pallidum antigen.
 2. **SAM DIL** Sample Diluent * 1 vial, 100 mL, ready to use; colored yellow; pH 7.2 ± 0.2.
 3. **IgG-RF SORB** IgG-RF-Sorbent *, 1 vial, 6.5 mL, ready to use; colored yellow; Contains anti-human IgG-class antibody.
 4. **CAL C** Pos. Control *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, red cap.
 5. **CAL A** Neg. Control *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, yellow cap.
 6. **CAL B** Cut-off Control *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, black cap.
 7. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate *, 1 vial, 20 mL, ready to use; colored red, antibody to human IgM conjugated to horseradish peroxidase.
 8. **SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
 9. **STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.2 mol/L H₂SO₄, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
 10. **WASH SOLN 20x** Wash Solution *, 1 vial, 30 mL (20X concentrated for 600 mL), pH 6.5 ± 0.1 see „Preparation of Reagents“.
- * contain non-mercury preservative

4.1.1 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 nm/620 nm ±10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Timer
- Absorbent paper

4.2 Storage Conditions and stability of the Kit

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.3 Reagent Preparation

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution

Dilute Wash Solution **1+19** (e.g. 10 mL + 190 mL) with fresh and germ free redistilled water. This diluted wash solution has a pH value of 7.2 ± 0.2.

Consumption: ~ 5 mL per determination.

Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. Be sure that the crystals are completely dissolved before use.

The diluted Wash Solution is stable for 4 weeks at 2 °C to 8 °C.

4.4 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.5 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN

Serum or plasma (EDTA, Li-heparin or citrate plasma) can be used in this assay.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general it should be avoided to use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 3 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 18 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay.

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

Prior to assaying each patient specimen is first to be diluted with Sample Diluent. For the absorption of rheumatoid factor these prediluted samples then have to be incubated with IgG-RF-Sorbent

1. Dilute each patient specimen **1+50** with Sample Diluent;
e.g. 10 µL of specimen + 0.5 mL of Sample Diluent. **Mix well.**
2. Mix well the IgG-RF-Sorbent before use.
3. Dilute this prediluted sample **1+1** with IgG-RF-Sorbent
e.g. 60 µL prediluted sample + 60 µL IgG-RF-Sorbent. **Mix well.**
4. **Let stand at room temperature for at least 15 minutes, up to a maximum of 2 hours and mix well again.**
5. Take 100 µL of these pretreated samples for the ELISA.

Please note: Controls are ready for use and must not be diluted!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- **It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature before starting the test run!**
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- During 37 °C incubation cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.

6.2 Test Procedure

Prior to commencing the assay, dilute Wash Solution, **prepare patient samples as described in point 5.3** and establish carefully the **distribution and identification plan** supplied in the kit for all specimens and controls.

1. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

- | | | | |
|---------|--------------|-------------------------|-----|
| 1 well | (e.g. A1) | for the Neg. Control, | |
| 2 wells | (e.g. B1+C1) | for the Cut-off Control | and |
| 1 well | (e.g. D1) | for the Pos. Control. | |

It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate.

2. Dispense
 - 100 µL** of Neg. Control into well A1
 - 100 µL** of Cut-off Control into wells B1 and C1
 - 100 µL** of Pos. Control into well D1 and
 - 100 µL** of each pre-treated sample with new disposable tips into appropriate wells.
3. Cover wells with foil supplied in the kit. Incubate for **60 minutes at 37 °C**.
4. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted Wash Solution (**300 µL per well**). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **100 µL** Enzyme Conjugate into each well.
6. Incubate for **30 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C)**.
Do not expose to direct sun light!
7. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted Wash Solution (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
8. Add **100 µL** of Substrate Solution into all wells.
9. Incubate for **exactly 15 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C) in the dark**.
Any blue color developed during the incubation turns into yellow.
Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen!
11. Read the optical density at **450/620 nm** with a microtiter plate reader **within 30 minutes** after adding the Stop Solution.

6.3 Measurement

Measure the optical density (OD) of all wells **at 450 nm** and record the OD values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable **calculate the mean OD values** of all duplicates.

7 RESULTS

7.1 Validation of the Test Run

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

Neg. Control in A1:	OD value lower than 0.200
Cut-off Control in B1/C1:	OD value between 0.350 - 0.850
Pos. Control in D1:	OD value between 0.650 - 3.000

The OD value of the Pos. Control should be higher than the OD value of the Cut-off Control.
(OD Pos. Control > OD Cut-off Control).

7.2 Calculation

Mean optical density (OD) value of Cut-off Control [CO]

Calculate the mean OD value of the two (2) Cut-off Control determinations (e.g. in B1/C1).

Example: $(0.44 + 0.46)/2 = 0.45 = \text{CO}$

7.3 Interpretation

POSITIVE	Patient (mean) OD values more than 10 % above CO (Mean OD patient > 1.1 x CO)
GREY ZONE	Patient (mean) OD values from 10 % above to 10 % below CO repeat test 2 - 4 weeks later - with <u>new</u> patient samples ($0.9 \times \text{CO} \leq \text{Mean OD patient} \leq 1.1 \times \text{CO}$)
NEGATIVE	Results in the second test again in the grey zone \Rightarrow NEGATIVE Patient (mean) OD values more than 10 % below CO (Mean OD patient < 0.9 x CO)

7.3.1 Results in DEMEDITEC Units [DU]

$\frac{\text{Patient (mean) OD value} \times 10}{\text{CO}} = [\text{DEMEDITEC Units} = \text{DU}]$

Example: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35 \text{ DU}$

Interpretation of Results

Cut-off value:	10	DU
Grey zone:	9 - 11	DU
Negative:	< 9	DU
Positive:	> 11	DU

8 QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.52 - 60 DU/mL.

9.2 Specificity of Antigen (Cross Reactivity)

The antigen used for the DEMEDITEC Treponema pallidum IgM ELISA shows no cross-reactivity to Epstein Barr Virus (VCA), Mycoplasma pneumonia, and Borrelia burgdorferi IgM antibodies.

9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by adding 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the negative control and was found to be 0.52 DU/mL (OD₄₅₀ = 0.025).

9.4 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. (Detected by method comparison with Mikrogen ELISA, with three lots of DEMEDITEC ELISA. 77 samples, therefrom 57 negative samples are assayed with DEMEDITEC ELISA lot 1-3.) It is 100% (for all three lots).

9.5 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. (Detected by method comparison with Mikrogen ELISA, with three lots of DEMEDITEC ELISA. 77 samples, therefrom 20 positive samples are assayed with DEMEDITEC lot 1-3.) It is 100% (for all three lots).

9.6 Method Comparison

The DEMEDITEC Treponema pallidum IgM ELISA was compared with another Treponema pallidum IgM ELISA (Mikrogen). 77 serum samples are assayed.

n =	77	Other ELISA	
		pos.	neg.
DEMEDITEC ELISA	pos.	20	0
	neg.	0	57

Agreement: 100%

9.7 Reproducibility

9.7.1 Intra-assay

The intra-assay (within-run) precision of the DEMEDITEC Treponema pallidum IgM ELISA was determined by 20 x measurements of 12 serum samples covering the whole measuring range.

Sample	Mean OD ₄₅₀	Intra-Assay CV (%)	n
1	0.37	8.3	20
2	0.24	9.6	20
3	0.51	8.6	20
4	0.94	6.3	20
5	0.94	7.1	20
6	0.67	6.5	20
7	1.30	3.7	20
8	1.35	3.4	20
9	1.44	3.4	20
10	1.96	2.5	20
11	2.08	2.8	20
12	1.62	4.8	20

9.7.2 Inter-assay

The inter-assay variation of the DEMEDITEC Treponema pallidum IgM ELISA was determined with 3 samples with 2 production kits in 10 independent runs with 2 replicates per run.

Sample	Mean OD ₄₅₀	Inter-Assay CV (%)	n
1	1.86	2.7	40
2	1.20	3.3	40
3	1.44	2.7	40

9.8 Linearity

Three samples (serum) containing different amounts of analyte were serially diluted with sample diluent and assayed with the DEMEDITEC ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

		Serum 1	Serum 2	Serum 3
Concentration	DU/mL	42.7	34.2	44.6
Average % Recovery		97.8	104.9	92.1
Min Recovery	from	86.6	95.1	86.0
Max Recovery	to	112.41	114.2	97.5
Status Linearity (100 +/-15%)		passed	passed	passed

10 LIMITATIONS OF USE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the optical density. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

10.1 Interfering Substances

In general, haemolytic, icteric or lipaemic samples should be avoided, but can be tolerated up to at least 4 mg/mL haemoglobin, 0.5 mg/mL Bilirubin, and 30 mg/mL triglycerides. None of the following samples with interference factors will interfere with the ELISA: samples with rheumatoid factor, samples with pregnancy hormones, samples with tumor marker (CYFRA, CA-72-4, CA-21-1, CA-15-3), samples with HAMA, samples with ANA and samples from elderly with high amount of proteins.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 INTRODUZIONE

L'immunoassay enzimatico **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM** fornisce materiale per la determinazione **qualitativa** e **semiquantitativa** di anticorpi della classe IgM per *Treponema pallidum* nel siero o plasma (EDTA, eparina di litio o plasma di citrato). **Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM ELISA** è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati.

In questo ELISA viene utilizzato un assorbente RF IgG. L'uso di anticorpi IgG anti-umani nel sorbente RF previene i risultati falsi positivi o falsi negativi. Per i dettagli, fare riferimento alle istruzioni per l'uso in inglese!

I campioni dei pazienti sono diluiti con il Sample Diluent e poi incubati con IgG-RF-Sorbent, Micropozzetti come fase solida sono ricoperti con l'antigene *Treponema pallidum*. **Campioni diluiti** di pazienti e **controlli pronti all'uso** sono pipettati in questi micropozzetti. Durante l'incubazione gli anticorpi specifici contro *Treponema pallidum* di campioni positivi e dei controlli si legano agli antigeni immobilizzati. Dopo i passaggi di lavaggio per rimuovere materiali dei campioni e controlli non legati, anticorpi anti-IgM umano coniugati alla perossidasi di rafano sono aggiunti ai pozzetti. Durante una seconda incubazione questi coniugati anti-IgM si legano in maniera specifica agli IgM anticorpi, risultando nella formazione di complessi immunologici-enzimatici. Dopo un secondo passaggio di lavaggio per rimuovere coniugati non legati, i complessi immunologici formati (nel caso di risultati positivi) sono evidenziati dalla incubazione del substrato TMB e da conseguente sviluppo di un colore blu. Il colore blu vira nel giallo dopo l'arresto della reazione enzimatica indicatore con acido solfidrico. L'intensità di questo colore è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo IgM *Treponema pallidum*-specifico nel campione del paziente. L'assorbanza a 450 nm viene determinata con un spettrofotometro ELISA per micropozzetti.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'insero del pacco a disposizione con il kit.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la Stop Solution dovrebbe essere evitato perché contiene 0.2 mol/L H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DEMEDIATEC Diagnostics GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti. Pozzetti ricoperti con Treponema pallidum antigene.
2. **SAM DIL Sample Diluent *** (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso, colore giallo; pH 7.2 ± 0.2 .
3. **IgG-RF SORB IgG-RF-Sorbent *** (Assorbente IgG-RF), 1 flacone, 6.5 mL, pronto all'uso, colore giallo; Contiene anticorpi della class IgG anti-umano.
4. **CAL C Pos. Control*** (Controllo positivo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo rosso.
5. **CAL A Neg. Control ***(Controllo negativo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo giallo.
6. **CAL B Cut-off Control *** (Controllo valore limite), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo nero.
7. **ENZ CONJ Enzyme Coniugate *** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso; colore rosso, anticorpo a IgM umano coniugato alla perossidasi di rafano.
8. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso TMB (benzidine tetrametilico).
9. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 0.2 mol/L H₂SO₄
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
10. **WASH SOLN 20x Wash Solution *** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (20 X concentrato per 600 mL), pH 6.5 ± 0.1 ; vedi „Preparazione dei reagenti“.

* Contiene conservante senza mercurio

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 nm/620 nm ± 10 nm)
- Micropipette di precisione variabili, calibrati
- Incubatore a 37 °C
- Materiale per il lavaggio automatico o manuale
- Agitatore vortex
- Acqua deionizzata o (al momento) distillata
- Cronometro
- Carta assorbente

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data. Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati da 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente. Test kit aperti rimangono attivi per 8 settimane se magazzinati come descritto sopra.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire la Wash Solution **1+19** (p.es. 10 mL + 190 mL) con acqua sterile ridistillata. Il valore pH in base a diluizione è $7,2 \pm 0,2$.

Consumo: ~ 5 mL per determinazione. I cristalli nella soluzione si sciolgono durante il riscaldamento a 37 °C in bagnomaria. Assicurarsi che i cristalli siano completamente dissolti prima dell'uso. La Wash Solution diluita è stabile per 4 settimane a 2 °C a 8 °C.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA, Li-eparina or citrate plasma) può essere usato per questo test.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

5.1 Collezione dei campioni

Siero: Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anti-coagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma: Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 3 giorni a 2 °C a 8 °C prima dell'utilizzo.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 18 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Prima dell'analisi ogni campione deve essere diluito con il Diluente dei campioni (Sample Diluent).

Per assicurare l'assorbimento di fattori reumatici, questi campioni pre-diluiti devono essere incubati con l'assorbente IgG RF (IgG-RF-Sorbent).

1. Diluire ogni campione dei pazienti **1 + 50** con il Sample Diluent; p.es. 10 µL di campione + 0.5 mL del Sample Diluent. **Agitare bene.**
2. Agitare bene IgG-RF-Sorbent prima dell'uso.
3. Diluire questi campioni pre-diluiti **1 + 1** con IgG-RF-Sorbent p.es. 60 µL campione prediluito + 60 µL IgG-RF-Sorbent. **Agitare bene**
4. **Lasciare riposare a temperatura ambiente per almeno 15 minuti, fino ad un massimo di 2 ore e mescolare bene.**
5. Prendere 100 µL di questi campioni pretrattati per l'ELISA.

Nota bene: Controlli sono pronti all'uso e non devono essere diluiti!

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- **È molto importante portare tutti i reagenti, campioni e controlli a temperatura ambiente prima dell'esecuzione del test!**
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
- Chiudere bene i flaconi dei reagenti immediatamente dopo l'uso per evitare l'evaporazione e la contaminazione microbica.
- Per evitare contaminazioni incrociate e risultati falsi pipettare i campioni e il tracciante sul fondo del pozzetto.
- Durante l'incubazione 37 °C coprire i pozzetti per evitare l'evaporazione.

6.2 Esecuzione del test

Prima d'iniziare con il test i **campioni dei pazienti da preparare com'è descritto del punto 5.3** e diluire la Wash Solution e si dovrebbe eseguire un piano di distribuzione ed identificazione per tutti i campioni e controlli sul prestampato fornito nel kit.

1. Selezionare il numero richiesto di strips o pozzetti e inserirli sul sostegno.

Si prega di collocare almeno:

- | | | |
|----------------------------|----------------------|---|
| 1 pozzetto (p.es. A1) | per il Neg. Control | |
| 2 pozzetti (p.es. B1 e C1) | per il Neg. Control | e |
| 1 pozzetto (p.es. D1) | per il Pos. Control. | |

È lasciato all'operator di determinare i controlli e i campioni in doppio.

2. Aggiungere
 - 100 µL** del Neg. Control nei pozzetto A1
 - 100 µL** del Cut-off Control nei pozzetti B1 + C1
 - 100 µL** del Pos. Control nel pozzetto D1 e
 - 100 µL** di ogni campione p r e t r a t t a t i con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.
3. Coprire i pozzetti con il foglio fornito nel kit. Incubare per **60 minuti a 37 °C**.
4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con Wash Solution diluita (**300 µL in ogni pozzetto**). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
5. Aggiungere **100 µL** del Enzyme Conjugate in ogni pozzetto.
6. Incubare per **30 minuti esattamente a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) al buio**.
Non esporre alla luce solare diretta!
7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con Wash Solution diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
8. Aggiungere **100 µL** di Substrate Solution in ogni pozzetti.
9. Incubare per **15 minuti esattamente a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) al buio**.
10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della Stop Solution in ogni pozzetto.
Il colore blu sviluppato vira al giallo.
Nota: Nei campioni fortemente positivi si può formare un precipitato scuro del cromogeno!
11. Determinare la densità ottica a **450/620 nm** con un fotometro **entro 30 minuti** dopo l'aggiunta della Stop Solution.

6.3 Misure fotometriche

Misurare la densità ottica (DO) di tutti i pozzetti a **450 nm** e riportare i valori DO di tutti i campioni e controlli del piano di distribuzione ed identificazione.

Determinazione a doppio raggio usando 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento è raccomandabile.

Dove possibile calcolare **il valore medio dei valori di DO** per tutti i campioni in doppio.

7 RISULTATI

7.1 Convalidazione del test

Il test può essere considerato valido se i seguenti criteri sono realizzati:

Neg. Control in A1: Valor di DO **inferiore a 0.200**

Cut-off Control in B1/C1: Valor di DO **tra 0.350 - 0.850**

Pos. Control in D1: Valor di DO **tra 0.650 - 3.000**

Il valore DO del controllo positivo deve essere superiore al valore DO del controllo Cut-off.

(DO Pos. Control > DO Cut-off Control)

7.2 Calcolo

Il valore medio delle densità ottica (DO) del Controllo valore limite [CO]

Calcolare il valore medio DO delle due (2) determinazioni del controllo valore limite (p.es. in B1/C1).

Esempio: $(0.44 + 0.46) / 2 = 0.45 = CO$

7.3 Interpretazione

POSITIVI Valori (medi) di DO dei pazienti almeno 10 % sopra il CO
(Medio $DO_{paziente} > 1.1 \times CO$)

ZONA GRIGIA Valori (medi) di DO da 10 % sopra a 10 % sotto il valore CO
ripetere il test 2-4 settimane dopo - con nuovi campioni dei pazienti.
($0.9 \times CO \leq DO_{medio\ paziente} \leq 1.1 \times CO$)

NEGATIVI Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia \Rightarrow **NEGATIVI**
Valori (medi) di DO almeno 10 % inferiore a CO
(Medio $DO_{paziente} < 0.9 \times CO$)

7.3.1 Risultati in unità DEMEDITEC [DU]

$\frac{\text{valori (medi) di DO dei pazienti} \times 10}{CO} = [\text{Unità DEMEDITEC} = DU]$

Esempio: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35 DU$

Interpretazione dei risultati

Valore di soglia: 10 DU

Zona grigia: 9 - 11 DU

Negativi: < 9 DU

Positivi: > 11 DU

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge.

Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno.

Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

È consigliabile di utilizzare programmi di valutazione di qualità nazionali o internazionali per assicurarsi la precisione dei risultati. Se i risultati del test non entrano nel campo dei controlli stabiliti, i risultati dei campioni dei pazienti dovrebbero essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti parametri tecnici: calibrazione delle micropipette e dei cronometri; spettrofotometro, date di scadenze dei reagenti, magazzinaggio e condizione di incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio. Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0.52 – 60 DU/mL.

9.2 Specificità degli antigene (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello Neg. Control ed erano 0.52 DU ($OD_{450} = 0.025$).

9.4 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati negativi con l'assenza del reagente analitico. E' 100%. Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Sensitività diagnostica

La sensitività diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati positivi con la presenza del reagente specifico. E' 100%. Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

Dati dettagliati su

9.6 Comparazione metodica

9.7 Precisione

9.8 Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONI DEL TEST

Contaminazioni batteriche o ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni possono influenzare i valori di assorbanza. Per pazienti immunosoppressi e per neonati i dati sierologici hanno una validità ristretta.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test. Nessuno dei seguenti campioni con possibili interferenze interferirà con l'ELISA: Campioni con fattori reumatoidi, campioni contenenti ormoni della gravidanza, campioni contenenti marcatori tumorali, campioni con HAMA o ANA e campioni di persone anziane con alta concentrazione di proteine.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. La diagnosi di una malattia infettiva non dovrebbe essere fondata sulla base di un solo risultato del test. La diagnosi precisa dovrebbe considerare la storia clinica, la sintomatologia e i dati sierologici. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

















11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento. Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamo, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.












12 REFERENCES / LITERATURE

1. Penn. C. W., M. J. Baily, and Cockayne. 1985. The axial filament antigen of Treponema pallidum. Immunology 54: 635-641
2. Luger, A., B.L. Schmidt, und F. Gschnait. 1983. Neue Fortschritte der Syphilisserologie. Wr. Klein. Wsch. 95: 440-443

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	<p>All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18 °C to 25 °C) before use.</p>
	<p>Dispense 100 µL of Controls into appropriate wells.</p>
	<p>Dispense 100 µL of sample into selected wells. (Please note special sample treatment, point 5.3!)</p>
	<p>Cover wells with foil. Incubate for 60 minutes at 37 °C.</p>
	<p>Briskly shake out the contents of the wells.</p>
	<p>Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µL per well).</p>
	<p>Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.</p>
	<p>Dispense 100 µL of Enzyme Conjugate into each well.</p>
	<p>Incubate for 30 minutes at room temperature.</p>
	<p>Briskly shake out the contents of the wells.</p>
	<p>Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µL per well).</p>
	<p>Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.</p>
	<p>Add 100 µL of Substrate Solution to each well.</p>
	<p>Incubate for 15 minutes at room temperature.</p>
	<p>Stop the reaction by adding 100 µL of Stop Solution to each well.</p>
	<p>Determine the optical density of each well at 450 nm.</p>

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
 Via Cavour, 35
 20063 Cernusco S/N (MI)
 telefono 02-92150794
 info@listarfish.it
 www.listarfish.it