

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Treponema pallidum (Syphilis) IgG ELISA



DE3517



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso 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	4
2	PRINCIPLE OF THE TEST	4
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
4	REAGENTS	6
5	SPECIMEN	7
6	ASSAY PROCEDURE	8
7	RESULTS	9
8	QUALITY CONTROL	9
9	ASSAY CHARACTERISTICS	10
10	LIMITATIONS OF USE	11
11	LEGAL ASPECTS.....	12
12	REFERENCES / LITERATURE	12
1	EINLEITUNG	13
2	TESTPRINZIP	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	14
5	PROBENVORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
7	ERGEBNISSE.....	16
8	QUALITÄTSKONTROLLE	17
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	18
10	GRENZEN DES TESTES	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	19
12	REFERENZEN / LITERATUR	19

1	INTRODUZIONE.....	20
2	PRINCIPIO DEL TEST	20
3	PRECAUZIONI	20
4	COMPONENTI DEL KIT	21
5	CAMPIONI	22
6	ATTUAZIONE DEL TEST	22
7	RESULTATI	23
8	CONTROLLO QUALITÀ	24
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	24
10	LIMITAZIONI.....	25
11	ASPETTI LEGALI	25
12	BIBLIOGRAFIA	25
1	INTRODUCCIÓN	26
2	PRINCIPIO DEL ENSAYO	26
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	27
4	REACTIVOS	28
5	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	29
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	29
7	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	30
8	CONTROL DE CALIDAD.....	31
9	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	32
10	LIMITACIONES DE USO.....	32
11	ASPECTOS LEGALES	33
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	33
	SHORT INSTRUCTIONS FOR USE.....	34
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	36

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC Treponema pallidum IgG Enzyme Immunoassay Kit** provides materials for the **qualitative** and **semiquantitative** determination of IgG-class antibodies to Treponema pallidum in serum or plasma (EDTA-, 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, 5-15µ in length and 0.2µ 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 **Treponema pallidum IgG ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter wells as a solid phase are coated with Treponema pallidum antigen.

Diluted 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 IgG antibodies are dispensed into the wells. During a second incubation this anti-IgG conjugate binds specifically to IgG 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 IgG antibody in the patient specimen. Absorbance 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 absorbance 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 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with inactivated *Treponema pallidum* antigen. (incl. 1 strip holder and 1 cover foil)
2. **SAM DIL Sample Diluent** *, 1 vial, 100 mL, ready to use, colored yellow; pH 7.2 ± 0.2 .
3. **CAL C Pos. Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, red cap.
4. **CAL A Neg. Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, yellow cap.
5. **CAL B Cut-off Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use; colored yellow, black cap.
6. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** *, 1 vial, 20 mL, ready to use, colored red, antibody to human IgG conjugated to horseradish peroxidase.
7. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.2 mol/L H_2SO_4 . Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **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 (450/620 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

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 two months 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 Sheets.

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-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.
Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

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

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time 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 dilute each patient specimen **1+100** with *Sample Diluent*; e.g. 10 µL of specimen + 1 mL of *Sample Diluent* (mix well).

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
- Absorbance 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 incubation cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.

6.2 Test Procedure

Prior to commencing the assay, the **distribution and identification plan** for all specimens and controls should be carefully established on a form supplied in the kit.

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 substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the <i>Neg. Control</i> ,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the <i>Cut-off Control</i> and
1 well	(e.g. E1)	for the <i>Pos. Control</i> .

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

100 µL of <i>Neg. Control</i>	into well B1
100 µL of <i>Cut-off Control</i>	into wells C1 and D1
100 µL of <i>Pos. Control</i>	into well E1 and
100 µL of each diluted sample	with <u>new disposable tips</u> into appropriate wells.

 Leave well A1 for substrate blank!
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, **except A1**.
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**.
10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well. 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

Adjust the ELISA microplate or microstrip reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results! **Measure the absorbance** of all wells **at 450 nm** and record the absorbance 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 absorbance 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:

Substrate blank in A1:	Absorbance value lower than 0.100
Neg. Control in B1:	Absorbance value lower than 0.200
Cut-off Control in C1/D1 :	Absorbance value between 0.350 – 0.850
Pos. Control in E1	Absorbance value between 0.650 – 3.000

7.2 Calculation

Mean absorbance value of Cut-off Control [CO]

Calculate the mean absorbance value of the two (2) Cut-off Control determinations (e.g. in C1/D1).

Example: $(0.49 + 0.51) / 2 = 0.50 = CO$

7.3 Interpretation

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

7.3.1 Results in Units [U]

$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{CO} = [\text{Units} = U]$

Example: $\frac{1.580 \times 10}{0.50} = 32 U$

Interpretation of Results

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

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 ASSAY CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.69 U/mL - 60 U/mL.

9.2 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 0.69 U/mL ($OD_{450} = 0.042$).

9.3 Specificity of Antigen

The antigen used for the DEMEDITEC Treponema pallidum IgG ELISA shows no cross-reactivity to Fasciola, Strongyloides, Ascaris, Schistosoma, Trichinella and Giardia lamblia. None of the following samples with interference factors will interfere with the ELISA: samples with HAMA or different ANA, samples with tumor marker (CYFRA), and samples with pregnancy hormones.

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. It is 100%.

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. It is 100%.

9.6 Method Comparison

The DEMEDITEC ELISA was compared to a commercially available CE-marked ELISA.

		Other commercial ELISA	
		pos.	neg.
n = 87 DEMEDITEC ELISA	pos.	51	0
	neg.	0	36

9.7 Reproducibility**9.7.1 The intra-assay**

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

Sample	Mean OD	Intra-Assay CV (%)	n
1	0.14	4.64	20
2	0.43	2.75	20
3	0.51	4.74	20
4	0.99	7.09	20
5	0.94	2.63	20
6	0.68	5.14	20
7	1.13	4.32	20
8	1.05	3.81	20
9	1.48	6.99	20
10	2.15	6.67	20
11	1.60	7.37	20
12	2.57	6.81	20

9.7.2 The inter-assay

The inter-assay variation of the DEMEDITEC ELISA was determined with cut-off control, positive control, and 3 samples with 2 production kits in 10 independent runs with 2 replicates per run.

Sample	Mean OD	Inter-Assay CV (%)	n
1	2.15	3.07	40
2	2.51	2.25	40
3	0.97	3.21	40

10 LIMITATIONS OF USE

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

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

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.

12 REFERENCES / LITERATURE

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

1 EINLEITUNG

Der **DEMEDITEC Treponema pallidum IgG ELISA** wird zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Treponema pallidum in Humanserum oder -plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der **DEMEDITEC Treponema pallidum IgG ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay. Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit Treponema pallidum-Antigen beschichtet. In diese Vertiefungen werden **verdünnte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert. Während der darauf folgenden Inkubation werden Treponema pallidum-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden. Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgG-Antikörper bindet und dadurch zur Bildung enzymmarkierter Immunkomplexe führt. Durch einen zweiten Waschvorgang wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die (bei positiven Resultaten) gebildeten Immunkomplexe werden durch Inkubation mit TMB-Substrat anhand einer blauen Farbreaktion, die nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure in gelb umschlägt, sicht- und messbar gemacht. Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Anti-Treponema pallidum-Antikörpermenge in der Patientenprobe direkt proportional. Die Extinktionsmessung bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,2 mol/L H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Verordnungen.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); Mit Treponema pallidum-Antigen beschichtet; (inkl. 1 Streifenhalter und 1 Abdeckfolie)
2. **SAM DIL Sample Diluent** * (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt; pH 7,2 ± 0,2
3. **CAL C Pos. Control** * (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, rote Kappe.
4. **CAL A Neg. Control** * (Negative Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, gelbe Kappe.
5. **CAL B Cut-off Control** * (Grenzwert-Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, schwarze Kappe.
6. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** * (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig; rot gefärbt, Antikörper gegen humanes IgG, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidin (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,2 mol/L H₂SO₄; Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **WASH SOLN 20x Wash Solution** * (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, (**20X** konzentriert für 600 mL) pH 6,5 ± 0,1; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Vortex-Mischer
- Aqua dest.
- Kurzzeitwecker
- Saugfähiges Papier

4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die *Microtiterwells* sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Waschlösung **1 + 19** (z.B. 10 mL + 190 mL) mit frischem, keimfreiem destilliertem Wasser verdünnen. Diese verdünnte Waschlösung hat einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2. Bedarf: ca. 5 mL pro Bestimmung. Kristalle in der Lösung durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C auflösen. Es muss sichergestellt sein, dass die Kristalle vollständig gelöst sind, bevor die Waschlösung verwendet wird.
Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C bis 8 °C für 2 Wochen stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen zu diesem Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.5 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren, bei -20 °C, bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Vor Testbeginn müssen die Patientenproben **1 + 100** mit *Sample Diluent* verdünnt werden; z.B. 10 µL Probe + 1 mL *Sample Diluent* (gut mischen).

Achtung: Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- **Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien, Proben und Kontrollen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen!**
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettivorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Reagenzfläschchen sofort nach Gebrauch wieder sorgfältig verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu verhindern.
- Die Patientenproben bzw. das Konjugat sorgfältig auf den Boden der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren (ohne den Rand zu benetzen!), um Kreuzkontaminationen und fälschlich erhöhte Ergebnisse zu vermeiden.
- *Microtiterwells* während der Inkubation durch Abdecken mit Abdeckfolie vor Verdunstung schützen.

6.2 Testdurchführung

Vor Beginn der Testdurchführung auf dem mitgelieferten **Übersichtsplan** die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen zur sicheren Identifizierung genau festlegen.

- Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen in den Streifenhalter einsetzen. Hierbei mindestens
1 Vertiefung (z.B. A1) für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefung (z.B. B1) für die *Neg. Control*
2 Vertiefungen (z.B. C1 + D1) für die *Cut-off Control* und
1 Vertiefung (z.B. E1) für die *Pos. Control* vorsehen.
Es bleibt dem Anwender überlassen, zur höheren Sicherheit für die Kontrollen und die Patientenproben Doppel- oder Mehrfachbestimmungen vorzusehen.
- 100 µL Neg. Control** in Vertiefung B1 je
100 µL Cut-off Control in die Vertiefungen C1 und D1
100 µL Pos. Control in Vertiefung E1 und
100 µL jeder verdünnten Patientenprobe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren. Vertiefung A1 für den Substratleerwert (Blank) reservieren!
- Die Mikrotiterstreifen mit der dem Testkit beiliegenden Folie abdecken. **60 Minuten bei 37 °C** inkubieren.
- Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen. **Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Testes wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
- 100 µL Enzyme-Conjugate** in jede Vertiefung geben, **außer in A1**.
- Die Mikrotiterstreifen **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C)** inkubieren. *Testansatz nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!*
- Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
- 100 µL Substrate Solution** in jede Vertiefung geben.
- Die Mikrotiterstreifen **15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) im Dunkeln** inkubieren
- Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jede Vertiefung abstoppen. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um. **Hinweis:** Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen!
- Die Optische Dichte bei **450/620 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **30 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Messung

Mit Hilfe des **Substratleerwertes (Blank) in A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Kalibrierung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Vertiefungen bei 450 nm messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in den Übersichtsplan eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den Mittelwert der Extinktionswerte berechnen.

7 ERGEBNISSE

7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Substrat-Leerwert in A1:	Extinktion niedriger als 0,100
Neg. Control in B1:	Extinktion niedriger als 0,200
Cut-off Control in C1 und D1:	Extinktionen zwischen 0,350 und 0,850
Pos. Control in E1:	Extinktion zwischen 0,650 und 3,000

7.2 Testauswertung

Extinktionsmittelwert der Grenzwert-Kontrolle (*Cut-off Control*) [CO]

Den Extinktionsmittelwert der 2 Grenzwert-Kontroll-Bestimmungen (z.B. in C1/D1) berechnen.

Beispiel: $(0.49 + 0.51) / 2 = 0.50 = CO$

7.3 Interpretation

POSITIV Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10% oberhalb des CO.
(Mittlere OD Probe $> 1.1 \times CO$)

GRAUZONE Patienten-Extinktions(mittel)werte von 10 % oberhalb bis zu 10 % unterhalb des CO.
Test 2 - 4 Wochen später wiederholen - mit frischer Patientenprobe.
($0.9 \times CO \leq \text{Mittlere OD Probe} \leq 1.1 \times CO$)

NEGATIV Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone $\Rightarrow$ **NEGATIV**.
Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10 % unterhalb des CO
(Mittlere OD Probe $< 0.9 \times CO$)

7.3.1 Ergebnisse in Units [U]

$\frac{\text{Patienten-Extinktions(mittel)wert} \times 10}{CO} = [\text{Units} = U]$

Beispiel: $\frac{1.580 \times 10}{0.50} = 32 U$

Interpretation der Ergebnisse

Cut-off-Wert: 10 U
Grauzone: 9 - 11 U
Negativ: < 9 U
Positiv: > 11 U

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Wenn die Ergebnisse des Testes nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,69 U/mL - 60 U/mL.

9.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung der neg. Kontrolle (n = 20), beträgt 0,69 U/mL (OD₄₅₀ = 0,042).

9.3 Spezifität des Antigens

Das für den DEMEDITEC Treponema pallidum IgG ELISA verwendete Antigen zeigt keine Kreuzreaktion mit Fasciola, Strongyloides, Ascaris, Schistosoma, Trichinella und Giardia lamblia. Proben mit HAMA oder verschiedenen ANA, Proben mit Tumormarker (CYFRA) und Proben mit Schwangerschaftshormonen interferieren nicht mit diesem ELISA.

9.4 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100%.

9.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100%.

9.6 Methodenvergleich

Der DEMEDITEC ELISA wurde mit einem kommerziell verfügbaren CE-markierten ELISA verglichen.

		Kommerzieller ELISA	
		pos.	neg.
n = 87 DEMEDITEC ELISA	pos.	51	0
	neg.	0	36

Die Daten zu:

9.7 Reproduzierbarkeit (Präzision)

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTES

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

L'immunoassay enzimatico **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgG** fornisce materiale per la determinazione **qualitativa** e **semiquantitativa** di anticorpi della classe IgG per *Treponema pallidum* nel siero o plasma (EDTA-, eparina- o citrato plasma).

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

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

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-IgG umano coniugati alla perossidasi di rafano sono aggiunti ai pozzetti.

Durante una seconda incubazione questi coniugati anti-IgG si legano in maniera specifica agli IgG 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 sulfidrico.

L'intensità di questo colore è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo IgG *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'inserito 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 Demeditec 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, (include 1 supporto per pozzetti e 1 fogli di copertura)
2. **SAM DIL Sample Diluent *** (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso, colore giallo, pH 7.2 ± 0.2 .
3. **CAL C Pos. Control *** (Controllo positivo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo rosso.
4. **CAL A Neg. Control *** (Controllo negativo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo giallo.
5. **CAL B Cut-off Control *** (Controllo valore limite), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso; colore giallo, tappo nero.
6. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate *** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso; colore rosso, anticorpo a IgG umano coniugato alla perossidasi di rafano.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso. TMB (benzidine tetrametilico).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 0.2 mol/L H_2SO_4 . Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **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 ± 10 nm)
- Micropipette di precisione variabili, calibrati
- Incubatore a $37^\circ C$
- 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 $2^\circ C$ a $8^\circ C$ 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 a $2^\circ C$ a $8^\circ C$. I micropozzetti devono essere magazzinati a $2^\circ C$ a $8^\circ C$. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente. Test kit aperti rimangono attivi per due mesi 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 $37^\circ C$ in bagnomaria. Assicurarsi che i cristalli siano completamente dissolti prima dell'uso. La Wash Solution diluita è stabile per 4 settimane a $2^\circ C$ a $8^\circ C$.

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-, Eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test.
Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

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 anticoagulante 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 5 giorni a 2 °C a 8 °C prima dell'utilizzo. Campioni magazzinati per un periodo più lungo 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'utilizzo diluire ogni campione dei pazienti **1 + 100** con il *Sample Diluent*;
P.es. 10 µL del campione + 1 mL del *Sample Diluent* (agitare bene).

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 coprire i pozzetti per evitare l'evaporazione.

6.2 Eseguito del test

Prima di iniziare con il test si dovrebbe eseguire un **piano di distribuzione ed identificazione** per tutti i campioni e controlli sul prestampato fornito nel kit.

- Selezionare il numero richiesto di strips o pozzetti e inserirli sul sostegno. Si prega di collocare almeno:
 1 pozzetto (p.es. A1) per il bianco,
 1 pozzetto (p.es. B1) per il *Neg. Control*
 2 pozzetti (p.es. C1 D1) 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.
- Aggiungere
 100 µL del *Neg. Control* nei pozzetto B1
 100 µL del *Cut-off Control* nei pozzetti C1 + D1
 100 µL del *Pos. Control* nel pozzetto E1 e
 100 µL di ogni campione diluito con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.
 Lasciare il pozzetto A1 vuoto per il bianco!
- Coprire i pozzetti con la foglia fornita nel kit. Incubare per **60 minuti a 37 °C**.
- 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 eseguito del lavaggio!
- Aggiungere **100 µL** del *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto, **eccetto A1**.
- Incubare per **30 minuti a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)**. *Non esporre alla luce solare diretta!*
- 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.
- Aggiungere **100 µL** di *Substrate Solution* in ogni pozzetti.
- Incubare per **15 minuti esattamente a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) al buio**.
- 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!
- Determinare la densità ottica a **450/620 nm** con un fotometro **entro 30 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Misure fotometriche

Azzerare lo strumento ELISA per micropiastre utilizzando il **bianco nel pozzetto A1**.

Se per motivi tecnici il fotometro ELISA non può essere azzerato utilizzando il bianco nel pozzetto A1, si deve sottrarre l'assorbanza il valore del pozzetto A1 da tutti gli altri valor misurati per ottenere risultati reali!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e riportare i valori 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 assorbanza** per tutti i campioni in doppio.

7 RESULTATI

7.1 Convalidazione del test

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

Valor bianco in A1: Assorbanza **inferiore a 0.100**
Neg. Control in B1: Assorbanza **inferiore a 0.200**
Cut-off Control in C1/D1: Valor di assorbanza **tra 0.350 - 0.850**
Pos. Control in E1: Valor di assorbanza **tra 0.650 - 3.000**

7.2 Calcolo

Il valore medio del Controllo valore limite [CO]

Calcolare il valore medio di assorbanza dei due (2) Controlli valore limite (p.es. In C1/D1).

Esempio: $(0.49 + 0.51) / 2 = 0.50 = CO$

7.3 Interpretazione

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

ZONA GRIGIA	Valori (medi) di assorbanza da 10 % sopra a 10 % sotto il valore CO ripetere il test 2-4 settimane dopo - con <u>nuovi</u> campioni dei pazienti. ($0.9 \times CO \leq DO_{\text{paziente}} \leq 1.1 \times CO$)
NEGATIVI	Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia $\Rightarrow$ NEGATIVI Valori (medi) di assorbanza almeno 10 % inferiore a CO (Medio $DO_{\text{paziente}} < 0.9 \times CO$)

7.3.1 Risultati in unità [U]

$\frac{\text{valori (medi) di assorbanza dei pazienti} \times 10}{CO} = [\text{Units} = U]$

Esempio: $\frac{1.580 \times 10}{0.50} = 32 U$

Interpretazione dei risultati

Valore di soglia:	10	U
Zona grigia:	9 - 11	U
Negativi:	< 9	U
Positivi:	> 11	U

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 d'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 0,69 U/mL - 60 U/mL.

9.2 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Neg. Control* ed erano 0,69 U/mL ($OD_{450} = 0,042$).

Dati dettagliati su

9.3 Specificità degli anticorpi

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

9.4 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati negativi con l'assenza del reagente analitico. È 100%.

9.5 Sensitività diagnostica

La sensitività diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati positivi con la presenza del reagente specifico. È 100%.

9.6 Comparazione metodica

Il kit DEMEDITEC ELISA è stato confrontato con un ELISA (con marchio CE) commercialmente disponibile.

		ELISA commerciale	
		pos.	neg.
n = 87 DEMEDIATEC ELISA	pos.	51	0
	neg.	0	36

Dati dettagliati su

9.7 Precisione

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

10 LIMITAZIONI

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.

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 DEMEDIATEC.

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 reclamazione, 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 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Uso previsto

El kit de inmunoensayo enzimático para IgG contra *Treponema pallidum* DEMEDITEC proporciona los materiales necesarios para la detección **cualitativa** y **semicuantitativa** de anticuerpos de clase IgG contra *Treponema pallidum* en suero humano o plasma (plasma con EDTA, heparina o citrato).

Esta prueba solo está prevista para uso diagnóstico *in vitro*.

1.2 Resumen y explicación

Consultar las instrucciones de uso en inglés.

2 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit de inmunoensayo enzimático para IgG contra *Treponema pallidum* ELISA de DEMEDITEC es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de fase sólida (ELISA).

Los pocillos en fase sólida se revisten con antígeno *Treponema pallidum*.

Las muestras **diluidas de pacientes** y los **controles listos para utilizar** se pipetea en estos pocillos. Durante la incubación, los anticuerpos específicos del *Treponema pallidum* de las muestras y controles positivos se unen a los antígenos inmovilizados.

Tras una fase de lavado para eliminar la muestra que no se ha unido y el material de control, los anticuerpos IgG antihumanos conjugados con peroxidasa de rábano se depositan en los pocillos.

Durante una segunda incubación, este conjugado de anti IgG se une específicamente a los anticuerpos IgG, lo que resulta en la formación de complejos inmunes ligados a enzimas.

Tras una segunda fase de lavado para eliminar los conjugados que no se han unido, se detectan los complejos inmunes formados (en el caso de los resultados positivos) a través de la incubación con sustrato de TMB y del desarrollo de un color azul. El color azul se vuelve amarillo cuando se detiene la reacción del indicador enzimático con ácido sulfúrico.

La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo IgG contra *Treponema pallidum* en la muestra del paciente. La absorbencia a 450 se lee mediante un lector de placas de ELISA.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este kit solo es para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
- Antes de comenzar la prueba, leer las instrucciones completamente y con atención. Utilizar la versión válida del prospecto que se incluye en el kit. Asegurarse de que comprende todo.
- Todos los reactivos de este kit de prueba que contengan suero o plasma humano se han analizado y se ha confirmado que los resultados son negativos para VIH I/II, HBsAg y VHC de acuerdo con los procedimientos aprobados por la FDA. No obstante, todos los reactivos se deben manipular y desechar como si supusiesen un riesgo biológico.
- Evitar contacto con la solución de parada de 0,2 mol/L H₂SO₄. Puede causar irritación cutánea y quemaduras.
- El sustrato de TMB produce un efecto irritante en la piel y las mucosas. En caso de contacto, lavarse los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lavar los objetos contaminados antes de volver a utilizarlos. En caso de inhalación, llevar a la persona afecta al exterior.
- La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben almacenarse de 2 - 8 °C en la bolsa sellada de papel de aluminio y deben utilizarse en la estructura provista para tal fin.
- El pipeteo de las muestras y los reactivos debe realizarse tan rápido como sea posible y siguiendo el mismo patrón en cada paso.
- Utilizar los reservorios únicamente para los reactivos individuales. Esto afecta a los reservorios de sustratos. La utilización de un reservorio para depositar una solución de sustrato que se ha usado anteriormente para la solución conjugada puede teñir la solución. No verter de nuevo los reactivos en los viales para que no contaminar la sustancia.
- Mezclar los contenidos de los pocillos de las microplacas enérgicamente para garantizar unos buenos resultados de la prueba. No utilizar de nuevo los micropocillos.
- No dejar que se sequen los pocillos durante la prueba, añadir los reactivos inmediatamente después de finalizar la fase de enjuague.
- Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (de 21 °C a 26 °C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbencia de la prueba. Sin embargo, los valores de las muestras de los pacientes no se verán afectados.
- No pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y de las muestras con la piel y con las mucosas.
- No fumar, comer, beber ni aplicarse productos cosméticos en zonas donde se manipulen muestras o reactivos del kit.
- Utilizar guantes desechables de látex al manipular las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos y las muestras puede provocar resultados falsos.
- La manipulación debe realizarse conforme a los procedimientos definidos por la legislación o las pautas de seguridad ante riesgos biológicos nacionales que procedan.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta del kit.
- Todos los volúmenes indicados deben realizarse conforme al protocolo. Los resultados de las pruebas solo serán óptimos si se utilizan pipetas y lectores de placas graduados.
- No mezclar ni utilizar componentes de kits que tengan un número de lote diferente. Se recomienda no intercambiar pocillos en distintas placas incluso si pertenecen al mismo lote. Puede que los kits se hayan transportado o almacenado en distintas condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar ligeramente distintas.
- Las sustancias químicas y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como desechos peligrosos de acuerdo con la legislación o las pautas en materia de seguridad ante riesgos biológicos nacionales.
- Para más información sobre las sustancias peligrosas que se incluyen en el kit, consultar la ficha de datos de seguridad.
La ficha de datos de seguridad de este producto se puede solicitar directamente a DEMEDITEC.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos incluidos

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropocillos), 12 x 8 tiras (separables), 96 pocillos; pocillos revestidos con antígeno de *Treponema pallidum* (incluye 1 soporte para las tiras y 1 lámina para cubierta).
2. **SAM DIL Sample Diluent** (Diluyente de muestras)*, 1 vial, 100 mL, listo para su uso, de color amarillo; pH $7,2 \pm 0,2$.
3. **CAL C Pos. Control** (Control positivo) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para su uso; de color amarillo, con tapón rojo.
4. **CAL A Neg. Control** (Control negativo) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para su uso; de color amarillo, con tapón amarillo.
5. **CAL B Cut-off Control** (Control límite) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para su uso; de color amarillo, con tapón negro.
6. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático) *, 1 vial, 20 mL, listo para su uso, de color rojo, anticuerpo al conjugado IgG humano a la peroxidasa de rábano.
7. **SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, lista para su uso, tetrametilbencidina (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, lista para su uso, contiene 0,2 mol/L H_2SO_4 . Evitar el contacto con la solución de parada. Puede causar irritación cutánea y quemaduras.
9. **WASH SOLN 20x Wash Solution** (Solución de lavado) *, 1 vial, 30 mL (20x concentrado para 600 mL), pH $6,5 \pm 0,1$, consulte «Preparación de los Reactivos».

* Contiene conservantes que no son de mercurio.

4.1.1 Material necesario pero no proporcionado

- Un lector graduado de placas (450/620 nm ± 10 nm)
- Micropipetas de precisión con variables calibradas.
- Incubador a 37 °C.
- Equipo manual o automático para enjuagar los pocillos.
- Agitador de tubos vorticiales.
- Agua desionizada o (recientemente) destilada.
- Cronómetro.
- Papel absorbente.

4.2 Condiciones de almacenaje

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo. Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.3 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Solución de lavado

Diluir **1+19** de la solución de lavado (es decir, 10 mL +190 mL) con agua redestilada aséptica. La solución de enjuague diluida tiene un valor de pH de $7,2 \pm 0,2$. Consumo: ~ 5 mL por determinación. Los cristales de la solución desaparecen al calentarlos a 37 °C al baño maría. Asegurarse de que los cristales se han disuelto por completo antes de utilizarlo.

La solución de lavado diluida permanece estable durante 4 semanas de 2 °C a 8 °C.

4.4 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.5 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Heparina o citrato). No utilizar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento y preparación de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo más largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Antes de analizar diluir cada muestra de paciente (**1+100**) con diluyente para muestras (*Sample Diluent*), es decir, 10 µL de muestra + 1 mL de diluyente para muestras. Mezclar bien.

Atención: Los controles están listos para su utilización y no se deben diluir.

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- **Es muy importante que todos los reactivos, muestras y controles estén a temperatura ambiente antes de empezar la prueba.**
- Una vez que se ha iniciado la prueba, se deben completar todos los pasos sin interrupciones.
- Utilizar puntas de pipetas desechables nuevas para cada calibrador, control o muestra para evitar que se produzca contaminación cruzada.
- La absorbencia es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén listos, destapados, todos los pocillos bien colocados en el soporte, etc. Esto garantizará que trascurra el mismo tiempo en cada paso de la fase de pipeteo sin interrupciones.
- Como normal general, la reacción enzimática es directamente proporcional al tiempo y la temperatura.
- Cerrar los viales de reactivos inmediatamente tras su uso para evitar su evaporación y la contaminación microbiana.
- Para evitar que se produzca contaminación cruzada y que se obtengan unos resultados elevados falsos, pipetear las muestras de pacientes y depositar el conjugado sin salpicar el fondo de los pocillos.
- Durante la incubación, cubrir las tiras con papel de aluminio para evitar que se evaporen.

6.2 Procedimiento de ensayo

Antes de comenzar el ensayo, establecer detenidamente el **plan de distribución e identificación** que se incluye en el kit para todas las muestras y controles.

1. Seleccionar el número necesario de tiras y pocillos e insertarlos en el soporte. Distribuir al menos:

1 pocillo	(i.e. A1)	para el control blanco de sustrato,	
1 pocillo	(i.e. B1)	para el <i>Neg. Control</i> (control negativo),	
2 pocillos	(i.e. C1+D1)	para el <i>Cut-off Control</i> (control límite)	y
1 pocillo	(i.e. E1)	para el <i>Pos. Control</i> (control positivo).	

 Es decisión del usuario determinar si se duplican los controles y las muestras de pacientes.
2. Depositar

100 µL de <i>Neg. Control</i>	en el pocillo	B1
100 µL de <i>Cut-off Control</i>	en los pocillos	C1 y D1
100 µL de <i>Pos. Control</i>	en el pocillo	E1

 y
100 µL de cada muestra diluida con puntas desechables nuevas en los pocillos correspondientes. Dejar el pocillo A1 para el *control blanco de sustrato*.
3. Cubrir los pocillos con el papel de aluminio que se incluye en el kit. Incubar durante **60 minutos a 37 °C**.
4. Agitar enérgicamente el contenido de los pocillos. Enjuagar los pocillos **5 veces** con la solución de lavado diluida (**300 µL por cada pocillo**). Golpear con fuerza los pocillos en papel absorbente para eliminar cualquier gota restante. **Nota importante:** El límite inferior de detección y la precisión de este ensayo están muy relacionados con la correcta realización del procedimiento de lavado.
5. Depositar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* (conjugado enzimático) en cada pocillo, **excepto en el A1**.
6. Incubar durante **30 minutos a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C)**.
No exponer directamente a la luz solar.
7. Agitar enérgicamente el contenido de los pocillos.
Enjuagar los pocillos **5 veces** con la solución de lavado diluida (300 µL por cada pocillo). Golpear con fuerza los pocillos en papel absorbente para eliminar cualquier gota restante.
8. Añadir **100 µL** de *Substrate Solution* (solución de sustrato) a todos los pocillos.
9. Incubar **exactamente durante 15 minutos a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) en un lugar oscuro**.
10. Detener la reacción enzimática añadiendo **100 µL** de *Stop Solution* (solución de parada) a cada pocillo. Todos los elementos que se volvieron azules durante la incubación se tornarán amarillos.
Nota: En las muestras de pacientes que presente un nivel positivo alto pueden formar precipitados oscuros en el cromógeno.
11. Leer la densidad óptica a **450/620 nm** con un lector de placas en los **30 minutos posteriores** a haber añadido la *solución de parada*.

6.3 Medición

Ajustar el lector de microplacas o microtiras de ELISA **a cero** mediante el **control blanco de sustrato del pocillo A1**.

Si, debido a motivos técnicos, el lector de ELISA no puede ajustarse a cero mediante el control blanco de sustrato del pocillo A1, restar el valor de absorbencia del pocillo A1 del resto de valores de absorbencia medidos para obtener unos resultados fiables.

Medir la absorbencia de todos los pocillos **a 450 nm** y registrar los valores de absorbencia de cada control y muestra de paciente del plan de distribución e identificación.

Se recomienda la lectura de la longitud de onda dual utilizando 620 nm como referencia.

Donde proceda, **calcular los valores de absorbencia promedio** de todos los duplicados.

7 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

7.1 Validación de la prueba

La prueba se considerará como válida cuando se cumplan los siguientes criterios:

Control blanco de sustrato en A1:	Nivel de absorbencia inferior a 0,100 .
Control negativo en B1:	Nivel de absorbencia inferior a 0,200 .
Control límite en C1/D1:	Nivel de absorbencia entre 0,350 – 0,850
Control positivo en E1:	Nivel de absorbencia entre 0,650 – 3,000

7.2 Cálculo

Valor de absorbencia promedio del control límite [CL]

Calcular el valor de absorbencia (DO) promedio de las (2) determinaciones del control límite (i.e. en C1/D1).

Ejemplo: $(0.49 + 0.51)/2 = 0.50 = CO$

7.3 Interpretación

POSITIVO

DO promedio del paciente $> 1,1 \times CL DO$

RESULTADO DUDOSO

$0,9 \times CL DO \leq DO \text{ promedio del paciente} \leq 1,1 \times CL DO$

Repetir la prueba de 2 a 4 semanas después con nuevas muestras del paciente.

Los resultados de la segunda prueba siguen siendo dudosos →

NEGATIVO.

NEGATIVO

DO promedio del paciente $< 0,9 \times CL DO$

7.3.1 Resultados en las unidades [U]

$$\frac{\text{Valor de absorbencia (promedio) del paciente} \times 10}{CL} = [\text{unidades} = U]$$

Ejemplo:
$$\frac{1,580 \times 10}{0,50} = 32 U$$

Interpretación de los resultados en U/mL

Valor límite: 10 U

Resultado dudoso: 9 - 11 U

negativo: $< 9 U$

positivo: $> 11 U$

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar las muestras de control conforme a la legislación regional y nacional. Se recomienda el uso de las muestras de control para garantizar la validez diaria de los resultados. Utilizar los controles tanto a nivel normal como patológico. También se recomienda hacer uso de los programas de evaluación de la calidad a nivel nacional e internacional para garantizar la exactitud de los resultados. Si los resultados del ensayo no cumplen los rangos estipulados de los materiales de controles, estos se deberán considerar como no válidos. En ese caso, comprobar los siguientes aspectos técnicos: Los dispositivos de pipeteo y de temporización, los fotómetros, las fechas de caducidad de los reactivos, las condiciones de almacenamiento e incubación y los métodos de aspiración y lavado. Tras comprobar los aspectos anteriores y no haber detectado ningún error, contactar con el distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,69 U/mL - 60 U/mL.

9.2 Límite inferior de detección analítico

El límite inferior de detección analítica de ELISA de DEMEDITEC se calculó mediante la adición de 2 desviaciones estándar del promedio de 20 análisis duplicados del control negativo y cuyo resultado fue 0,69 U/mL ($DO_{450} = 0,042$).

Para información sobre

9.3 Especificidad de los Anticuerpos

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

9.4 Especificidad del diagnóstico

La especificidad del diagnóstico se define como la probabilidad de que el ensayo dé un resultado negativo si no hay un análisis específico. Es 100%.

9.5 El límite inferior de detección diagnóstica

El límite inferior de detección diagnóstica se define como la probabilidad de que el ensayo dé un resultado positivo si hay un análisis específico. Es 100%.

9.6 Comparación de métodos

El DEMEDITEC ELISA se comparó con un ELISA (con CE) disponible comercialmente.

		ELISA comercial	
		pos.	neg.
DEMEDITEC ELISA	pos.	51	0
	neg.	0	36

n = 87

Para información sobre

9.7 Resultados de Precisión

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

La contaminación bacteriana o los ciclos repetidos de congelación-descongelación de la muestra pueden afectar a los valores de absorbencia. Los datos serológicos de los pacientes inmunocomprometidos y los recién nacidos solo tiene valor restringido.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Más aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo. Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente. El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se determinará con el resultado de una sola prueba. Un diagnóstico preciso debe contemplar la historia clínica, la sintomatología y los datos serológicos. Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas. Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

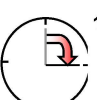
11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición. Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use.
	Leave well A1 for substrate Blank. Dispense 100 µl of Controls into appropriate wells.
	Dispense 100 µl of sample into selected wells.
	Cover wells with foil. Incubate for 60 minutes at 37 °C.
	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.
	Dispense 100 µl of Enzyme-Conjugate into each well.
	Incubate for 30 minutes at room temperature.
	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.
	Add 100 µl of Substrate Solution to each well.
	Incubate for 15 minutes at room temperature.
	Stop the reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
	Determine the absorbance of each well at 450 nm.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	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	utilisation 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 catalogo
	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 y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température 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
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta