

Product information

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



User's Manual

Treponema pallidum (Syphilis) IgM ELISA



DE4267



96 wells



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

**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'inserto 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	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	14
5	PROBENVORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	16
7	ERGEBNISSE	18
8	QUALITÄTSKONTROLLE	18
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	19
10	GRENZEN DES TESTES	19
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	20
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
1	INTRODUCCIÓN	28
2	PROCEDIMIENTO DEL TEST	28
3	PELIGROS Y PRECAUCIONES	29
4	COMPONENTES DEL KIT	30
5	MUESTRAS	31
6	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	32
7	RESULTADOS	33
8	CONTROL DE CALIDAD	33
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	34
10	LIMITACIONES DE USO	34
11	ASPECTOS LEGALES	35
12	REFERENCES / LITERATURE	36
	SHORT INSTRUCTIONS FOR USE	37
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	40

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC 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 **DEMEDITEC 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 ($0.9 \times \text{CO} \leq \text{Mean OD patient} \leq 1.1 \times \text{CO}$)
	Results in the second test again in the grey zone \Rightarrow NEGATIVE
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 EINLEITUNG

Der **DEMEDITEC Treponema pallidum IgM ELISA** wird zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Treponema pallidum in Humanserum oder -plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt. **Nur für In-vitro Diagnostik.**

2 TESTPRINZIP

Der **DEMEDITEC Treponema pallidum IgM ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay. In diesem ELISA wird ein IgG-RF-Sorbent eingesetzt. Der Rheumafaktor (RF) ist eine besondere Autoantikörperform. Es handelt sich dabei um Autoantikörper, die wiederum selbst gegen Antikörper gerichtet sind und zwar gegen das Fc-Fragment der menschlichen IgG. Die RF-Autoantikörper sind meistens Klasse IgM, können aber auch Klasse IgA, IgG oder IgE sein. Die Rheumafaktoren werden mit der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht. Aber auch bei anderen Erkrankungen (z.B. Tuberkulose, Salmonellose, Syphilis u.a.) und sogar bei Gesunden können sie nachweisbar sein. Bei rund 5% aller Gesunden können erhöhte RF-Werte gefunden werden; dabei steigt der Titer mit zunehmenden Alter. Durch die Verwendung von Anti-human-IgG-Antikörpern im RF-Sorbent werden falsch positive oder falsch negative Ergebnisse verhindert. In einem dem Testablauf vorangehenden vorbereitenden Schritt werden die Patientenproben mit Sample Diluent verdünnt und zusätzlich mit IgG-RF-Sorbent inkubiert. Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit Treponema pallidum-Antigen beschichtet. In diese Vertiefungen werden **vorbehandelte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipetiert. 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-IgM-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgM-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 Messung der optischen Dichte 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.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- 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 EU-Verordnungen

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT** Microtiterwells 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); Mit Treponema pallidum-Antigen beschichtet.
 2. **SAM DIL** Sample Diluent * (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt; pH 7,2 ± 0,2.
 3. **IgG-RF SORB** IgG-RF-Sorbent *, 1 vial, 6.5 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt; Enthält anti-human IgG-Antikörper.
 4. **CAL C** Pos. Control * (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, rote Kappe.
 5. **CAL A** Neg. Control * (Negative Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, gelbe Kappe.
 6. **CAL B** Cut-off Control * (Grenzwert-Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig; gelb gefärbt, schwarze Kappe.
 7. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate * (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig; rot gefärbt, Antikörper gegen humanes IgM, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
 8. **SUB TMB** Substrate Solution (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidin (TMB).
 9. **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.
 10. **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 (450 nm/620 nm ±10 nm),
- 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 8 Wochen 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.

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-, Li-Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „Interferenzen“.

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 3 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 18 Monaten) 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 werden die Patientenproben zuerst mit Sample Diluent verdünnt. Anschließend werden diese vorverdünnten Proben mit IgG-RF-Sorbent inkubiert um Rheumafaktoren zu eliminieren.

1. Jede Patientenprobe **1+50** mit Sample Diluent verdünnen;
z.B. 10 µL Probe + 0.5 mL of Sample Diluent. **Gut mischen.**
2. Vor Gebrauch das IgG-RF-Sorbent gut mischen.
3. Die vorverdünnte Probe **1+1** mit IgG-RF-Sorbent verdünnen
z.B. 60 µL vorverdünnte Probe + 60 µL IgG-RF-Sorbent. **Gut mischen.**
4. **Mindestens 15 Minuten, bis maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen und danach nochmals gut mischen.**
5. 100 µL dieser vorbehandelten Probe werden in den ELISA eingesetzt.

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 Pipettiervorgang 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 37 °C Inkubation durch Abdecken mit Abdeckfolie vor Verdunstung schützen.

6.2 Testdurchführung

Vor Beginn der Testdurchführung die Wash Solution verdünnen, die **Patientenproben vorbereiten, wie unter Punkt 5.3 beschrieben** und auf dem mitgelieferten **Übersichtsplan** die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen zur sicheren Identifizierung genau festlegen.

1. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

- | | | | |
|----------------|----------------|-------------------------|-----------|
| 1 Vertiefung | (z.B. A1) | für die Neg. Control | |
| 2 Vertiefungen | (z.B. B1 + C1) | für die Cut-off Control | und |
| 1 Vertiefung | (z.B. D1) | für die Pos. Control | vorsehen. |

Es bleibt dem Anwender überlassen, zur höheren Sicherheit für die Kontrollen und die Patientenproben Doppel- oder Mehrfachbestimmungen vorzusehen.

2. **100 µL** Neg. Control in Vertiefung A1 je
100 µL Cut-off Control in die Vertiefungen B1 und C1
100 µL Pos. Control in Vertiefung D1 und
100 µL jeder v o r b e h a n d e l t e n Patientenprobe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. Die Mikrotiterstreifen mit der dem Testkit beiliegenden Folie abdecken.
60 Minuten bei 37 °C inkubieren.
4. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5-mal** 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!
5. **100 µL** Enzyme-Conjugate in jede Vertiefung geben.
6. Die Mikrotiterstreifen **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C)** inkubieren.
 Testansatz nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!
7. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5-mal** mit verdünnter Wash Solution (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100 µL** Substrate Solution in jede Vertiefung geben.
9. Die Mikrotiterstreifen **exakt 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) im Dunkeln** inkubieren
10. 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!
11. Die Optische Dichte bei **450/620 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **30 Minuten** nach Zugabe der Stop Solution bestimmen.

6.3 Messung

Die optische Dichte 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 optischen Dichte berechnen.

7 ERGEBNISSE

7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Neg. Control in A1:	OD niedriger als 0,200
Cut-off Control in B1 und C1:	OD zwischen 0,350 - 0,850
Pos. Control in D1:	OD zwischen 0,650 - 3,000

Der OD-Wert der Pos. Control muss größer sein als der OD-Wert für die Cut-off Control.

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

7.2 Testauswertung

Mittelwert der optischen Dicht (OD) der Grenzwert-Kontrolle (Cut-off Control) [CO]

Den Mittelwert der OD der zwei Grenzwert-Kontroll-Bestimmungen (z.B. in B1/C1) berechnen.

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

7.3 Interpretation

POSITIV OD-(Mittel)werte der Patienten mehr als 10% oberhalb des CO.
(Mittlere OD_{Probe} > 1.1 x CO)

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

Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone \Rightarrow **NEGATIV**.
NEGATIV OD-(Mittel)werte der Patienten mehr als 10 % unterhalb des CO
(Mittlere OD_{Probe} < 0.9 x CO)

7.3.1 Ergebnisse in DEMEDITEC Units [DU]

$\frac{\text{OD-(Mittel)wert des Patienten} \times 10}{\text{CO}} = [\text{DEMEDITEC Units} = \text{DU}]$

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

Interpretation der Ergebnisse

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

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 0,52 DU – 60 DU/mL.

9.2 Spezifität des Antigens (Kreuzreaktivität)

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Epstein-Barr Virus (VCA) IgM, Mycoplasma pneumoniae IgM und Borrelia burgdorferi IgM festgestellt.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung der neg. Kontrolle (n = 20), beträgt 0,52 DU (OD₄₅₀ = 0,025).

9.4 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch einen Vergleich mit Mikrogen Treponema pallidum IgM ELISA über 3 DEMEDITEC Produktionschargen mit 77 Proben, davon 57 negative für DEMEDITEC Charge 1-3.) Sie beträgt 100% (für alle 3 Chargen).

9.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch einen Vergleich mit Mikrogen Treponema pallidum IgM ELISA über 3 DEMEDITEC Produktionschargen mit 77 Proben für DEMEDITEC Charge 1-3, davon 20 positive). Sie beträgt 100% (für alle 3 Chargen).

Die Daten zu:

9.6 Methodenvergleich

9.7 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.8 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

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. Keine der folgenden Proben mit möglichen Interferenzen stören den ELISA: Proben mit Rheumafaktoren, Proben die Schwangerschaftshormone enthalten, Proben die Tumormarker enthalten, Proben mit HAMA oder ANA und Proben von älteren Menschen mit hoher Proteinkonzentration.

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.

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 H_2SO_4
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 x 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.
($0.9 \times CO \leq DO \text{ medio}_{\text{paziente}} \leq 1.1 \times CO$)

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 x CO)

7.3.1 Risultati in unità DEMEDITEC [DU]

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

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

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.

1 INTRODUCCIÓN

El **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM Enzyme Immunoassay Kit** contiene componentes para la determinación **cualitativa** y semi-cuantitativa de anticuerpos clase IgM contra Treponema pallidum en suero humano ou plasma (EDTA, heparina de litio o plasma citrado).

Este ensayo está previsto exclusivamente para uso diagnóstico in vitro.

2 PROCEDIMIENTO DEL TEST

El **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM ELISA Kit** es un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

En este ELISA, se utiliza un absorbente de IgG-RF. El uso de anticuerpos anti-IgG humana en el absorbente de RF evita resultados falsos positivos o falsos negativos. Para más detalles, consulte las instrucciones de uso en inglés.

Las muestras de pacientes se diluyen con Diluyente de la muestra (Sample Diluent) y adicionalmente, se incuban con un Sorbente (IgG-RF-Sorbent).

Placas de microtitulación como fase sólida son recubiertas con antígeno de Treponema pallidum.

Muestras pretratadas del paciente y controles listos para usar se pipetea dentro de los pocillos. Durante la incubación, los anticuerpos específicos anti-Treponema pallidum de muestras positivas y de los controles se unen a los antígenos inmovilizados. Después de un paso de lavado para eliminar la muestra que no se ha unido y el material control, se añaden a los pocillos anticuerpos anti-humano clase IgM conjugados con peroxidasa de rábano. En una segunda incubación, este conjugado anti-IgM se une específicamente a anticuerpos IgM resultando en la formación de inmunocomplejos ligados a enzimas. Después de un segundo paso de lavado para eliminar el conjugado que no se ha unido, los inmunocomplejos formados (en caso de resultado positivo) se detectan por incubación con sustrato TMB y por la aparición de color azul. El color azul se torna amarillo al detener la reacción enzimática con ácido sulfúrico. La intensidad de este color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM anti-Treponema pallidum en la muestra del paciente. La absorbancia a 450 nm se mide usando un lector de microplacas ELISA.

3 PELIGROS Y PRECAUCIONES

- Este kit es exclusivamente para uso diagnóstico in vitro. Para uso profesional únicamente.
- Antes de empezar el ensayo, lea cuidadosa e íntegramente las instrucciones de uso. Utilice la versión en vigor del prospecto que se acompaña con el kit. Asegúrese de que entiende todo correctamente.
- Todos los componentes del kit que contienen suero humano o plasma han sido analizados y han resultado negativos para VIH I/II, HBsAg (hepatitis B) y HCV (hepatitis C) usando procedimientos aprobados por la FDA. Todos los reactivos, de cualquier modo, son potencialmente dañinos al usarlos y en el momento de su desecho.
- Evite el contacto con la Solución stop (Stop Solution) ya que contiene 0.2 mol/L H₂SO₄. Puede causar irritación en la piel y quemaduras.
- La Solución sustrato TMB (Substrate Solution) tiene un efecto irritante en la piel y mucosas. En caso de posible contacto, lave los ojos con un abundante volumen de agua y la piel con jabón y mucha agua. Lave objetos contaminados antes de reusarlos. Si inhalado, exponga a la persona a aire fresco.
- La placa de microtitulación contiene tiras desechables. Pocillos sin usar deben conservarse a 2 °C - 8 °C en la bolsita de aluminio herméticamente cerrada y deben usarse en el soporte provisto.
- El pipeteo de las muestras y reactivos debe realizarse tan rápido como sea posible y en la misma secuencia en cada paso.
- Utilice los recipientes para solo un reactivo. Especialmente para el sustrato. Utilizar un recipiente para administrar la solución sustrato que ha sido anteriormente usado para el conjugado puede hacer que la solución cambie de color. No devuelva los reactivos a los viales porque ello podría causar contaminación.
- Resuspenda el contenido de los pocillos de la placa de microtitulación cuidadosamente para asegurar resultados del test fiables. No reutilice pocillos.
- No permita que se sequen los pocillos durante el ensayo; añada los reactivos inmediatamente después de los pasos de lavado.
- Deje que los reactivos alcancen temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de comenzar el test. La temperatura afecta las mediciones de absorbancia del ensayo. De todos modos, los valores de las muestras del paciente no se verán afectados.
- Nunca pipetee con la boca y evite el contacto de los reactivos con la piel y mucosas.
- No fume, coma, beba o use cosméticos en áreas en las que se usen los reactivos del kit.
- Lleve guantes de latex desechables cuando utilice los componentes del kit. La contaminación microbiana de reactivos y muestras podría dar resultados erróneos.
- El manejo del kit debería realizarse en concordancia con los procedimientos definidos por las bases reguladoras nacionales de seguridad ante riesgos biológicos.
- No use los reactivos más allá de la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser aplicados siguiendo el protocolo. Únicamente se obtendrán resultados óptimos usando pipetas calibradas y lectores de placas de microtitulación.
- No mezcle o use componentes de kits con distintos números de lote. Se aconseja no intercambiar pocillos de distintas placas incluso del mismo lote. Los kits podrían haber sido transportados o almacenados en distintas condiciones y la afinidad de los anticuerpos podría resultar ligeramente diferente.
- Compuestos químicos y reactivos preparados o usados han de ser tratados como desechos peligrosos siguiendo las bases reguladoras nacionales de seguridad ante riesgos biológicos.
- Para información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit consulte las hojas de datos de seguridad de los materiales. Las fichas de datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DEMEDITEC.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Contenido del Kit

1. **SORB MT** Placas de microtitulación, 12 x 8 tiras (desechables), 96 pocillos; Pocillos recubiertos con antígeno de *Treponema pallidum*.
2. **SAM DIL** Sample Diluent (Diluyente de la muestra) * 1 vial, 100 mL, listo para usar, coloración amarilla; pH 7.2 ± 0.2 .
3. **IgG-RF SORB** IgG-RF-Sorbent (Sorbente para eliminar IgG-factores reumatoides) *, 1 vial, 6,5 mL, listo para usar, coloración amarilla; Contiene anticuerpo clase IgG anti-humano.
4. **CAL C** Pos. Control (Control positivo) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para usar, coloración amarilla, tapa roja.
5. **CAL A** Neg. Control (Control negativo) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para usar, coloración amarilla, tapa amarilla.
6. **CAL B** Cut-off Control (Control límite de corte) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para usar, coloración amarilla, tapa negra.
7. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate (Conjugado enzimático) *, 1 vial, 20 mL, listo para usar, coloración roja, anticuerpo anti-IgM humana conjugado con peroxidasa de rábano.
8. **SUB TMB** Substrate Solution (Solución sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbenzidina (TMB).
9. **STOP SOLN** Stop Solution (Solución stop), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0,2 mol/L H_2SO_4 . Evite el contacto con la solución stop. Puede causar irritación en la piel y quemaduras.
10. **WASH SOLN 20x** Wash Solution (Solución de lavado) *, 1 vial, 30 mL (concentrada 20X para volumen final de 600 mL), pH $6,5 \pm 0,1$ consulte "Preparación de reactivos".

* Contiene conservante sin mercurio.

4.1.1 Material necesario pero no provisto

- Un lector de microplacas calibrado (450/620 nm ± 10 nm)
- Micropipetas de precisión calibradas
- Incubador 37 °C
- Equipamiento manual o automático para el lavado de los pocillos
- Agitador vórtex
- Agua desionizada o (recientemente) destilada
- Cronómetro
- Papel absorbente

4.2 Condiciones de almacenamiento y estabilidad del Kit

Si se almacenan a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantendrán la reactividad hasta la fecha de caducidad. No use los reactivos más allá de la fecha indicada. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas de microtitulación deben conservarse a 2 °C - 8 °C. Una vez la bolsa de papel se ha abierto, ha de cerrarse hermética y cuidadosamente. Los kits abiertos retienen la actividad durante 8 semanas si se almacenan como se describe anteriormente.

4.3 Preparación de los reactivos

Deje que los reactivos y el número de tiras que necesite utilizar alcancen temperatura ambiente antes de usarlos.

Wash Solution (Solución de lavado)

Diluya la Solución de lavado (Wash Solution) **1+19** (p.e. 10 mL + 190 mL) con agua bidestilada fresca y libre de gérmenes. Esta solución de lavado diluida tiene un pH de $7,2 \pm 0,2$.

Consumo: ~ 5 mL por test individual. Los cristales en la solución desaparecen calentando a 37 °C en el baño de agua. Asegúrese de que los cristales estén completamente disueltos antes de usar la solución. La Solución de lavado diluida es estable durante 4 semanas a 2 °C - 8 °C.

4.4 Desecho del Kit

El desecho del Kit ha de realizarse conforme a la regulación nacional en vigor. Información adicional sobre este producto se ofrece en las hojas de datos de seguridad.

4.5 Kits de ensayo dañados

En caso de cualquier daño severo en el kit o en sus componentes, DEMEDITEC ha de ser informada por escrito una semana después de recibir el Kit como fecha límite. Componentes individuales que hayan sufrido daños importantes no deberían usarse para realizar el test. Han de ser almacenados hasta que se haya encontrado una solución final al problema. Después de encontrarse una solución, pueden ser desechados en concordancia con las reglas oficiales en vigor.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Li-Heparina o citrato).

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "Sustancias que pueden interferir".

5.1 Colección 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 centrifuga 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 3 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo más largo (hasta 18 meses) 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 muestras

Antes de realizar el ensayo, cada muestra del paciente se diluye primero con Diluyente de muestra (Sample Diluent). Para una eficiente absorción del factor reumatoide, las muestras diluídas tienen que incubarse con el Sorbente para eliminar IgG-factores reumatoides (IgG-RF-Sorbent).

1. Diluya cada muestra del paciente **1+50** con el Diluyente de muestra (Sample Diluent); p.e. 10 µL de muestra + 0.5 mL de diluyente de muestra (Sample Diluent). **Mezclar bien.**
2. Mezcle bien el Sorbente para eliminar IgG-factores reumatoides (IgG-RF-Sorbent) antes de su uso.
3. Diluya esta muestra prediluída **1+1** con el Sorbente para eliminar IgG-factores reumatoides (IgG-RF-Sorbent) p.e. 60 µL de muestra prediluída + 60 µL de IgG-RF-Sorbent. **Mezclar bien.**
4. **Dejar reposar a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos, hasta un máximo de 2 horas y volver a mezclar bien.**
5. Tome 100 µL de estas muestras pretratadas para el ELISA.

Advertencia: ¡Los controles están listos para usar y no deben diluirse!

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Observaciones generales

- **Es muy importante dejar que todos los reactivos, muestras y controles alcancen temperatura ambiente antes de empezar el test!**
- Una vez el test se ha empezado, todos los pasos han de completarse sin interrupción.
- Use nuevas puntas de pipeta desechables para cada componente, control o muestra para evitar contaminación cruzada.
- La absorbancia medida está en función del tiempo de incubación y de la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén listos para usar, sin tapa, todos los pocillos necesarios asegurados en el soporte, etc.. Ello garantizará que el tiempo transcurrido entre cada paso del protocolo tenga una duración semejante.
- Como regla general, la reacción enzimática es directamente proporcional al tiempo transcurrido y a la temperatura.
- Cierre herméticamente los tubos de reactivos inmediatamente después de su uso para evitar su evaporación o contaminación microbiana.
- Para evitar contaminación cruzada y resultados artificialmente elevados, pipeteo las muestras del paciente y aplique el conjugado cuidadosamente en el fondo de los pocillos.
- Durante la incubación a 37 °C, cubrir las tiras con papel de aluminio para evitar que se evaporen.

6.2 Procedimiento del test

Antes de comenzar el ensayo, diluya la Solución de lavado (Wash Solution), **prepare las muestras del paciente como se describe en el punto 5.3** y establezca cuidadosamente el **plan de distribución e identificación** provisto en el kit para todas las muestras y controles.

1. Seleccione el número de tiras o pocillos necesarios e insértelos en el soporte.

Por favor, asigne al menos:

1 pocillo	(p.e. A1)	para el Control negativo,	
2 pocillos	(p.e. B1+C1)	para el Control límite de corte (Cut-off Control)	y
1 pocillo	(p.e. D1)	para el Control positivo.	

Se deja al criterio del usuario si es necesario que las determinaciones de muestras control y del paciente se hagan por duplicado.

2. Dispense

100 µL del Control negativo (Neg. Control)	en el pocillo A1
100 µL del Control límite de corte (Cut-off Control)	en los pocillos B1 y C1
100 µL del Control positivo (Pos. Control)	en el pocillo D1

 y
100 µL de cada muestra pretrata da con puntas de pipeta nuevas en los pocillos apropiados.
3. Cubra los pocillos con el lámina autoadhesiva incluido en el kit. Incube durante **60 minutos a 37 °C**.
4. Mezcle vigorosamente el contenido de los pocillos.
Lave los pocillos **5 veces** con Solución de lavado diluída (Wash Solution) usando **300 µL por pocillo**. Golpee bruscamente los pocillos en papel absorbente para descartar las gotas restantes.
Nota importante:
¡La sensibilidad y precisión de este ensayo está marcadamente influenciada por una correcta ejecución de los pasos de lavado!
5. Dispense **100 µL** del Conjugado enzimático (Enzyme Conjugate) en cada pocillo.
6. Incube durante **30 minutos a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C)**.
¡No exponga los pocillos a luz directa!
7. Mezcle vigorosamente el contenido de los pocillos.
Lave los pocillos **5 veces** con Solución de lavado diluída (Wash Solution) usando **300 µL por pocillo**. Golpee bruscamente los pocillos en papel absorbente para descartar las gotas restantes.
8. Dispense **100 µL** de Solución sustrato (Substrate Solution) en todos los pocillos.
9. Incube durante **exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) en la oscuridad**.
10. Detenga la reacción enzimática añadiendo **100 µL** de Solución stop (Stop Solution) a cada pocillo.
El color azul de la incubación se vuelve amarillo.
Nota: ¡Muestras de pacientes muy positivas pueden causar precipitados oscuros del cromógeno!
11. Mida la absorbancia a **450/620 nm** con un lector de microplacas **no después de 30 minutos** de añadir la Solución stop (Stop Solution).

6.3 Medición

Mida la densidad óptica (DO) de todos los pocillos a 450 nm y anote los valores de DO para cada control y muestra del paciente en el plan de distribución e identificación.

Se recomienda una lectura de longitud de onda doble usando 620 nm como longitud de onda de referencia. Si es preciso, calcule la **media de los valores de DO** de todos los duplicados.

7 RESULTADOS

7.1 Validación de la prueba

La prueba puede considerarse válida cuando los siguientes criterios se cumplan:

Control negativo en A1: Valor de DO **menor de 0,200**

Control límite de corte en B1/C1: Valor de DO **entre 0,350 – 0,850**

Control positivo en D1: Valor de DO **entre 0,650 – 3,000**

7.2 Cálculo

El valor medio de la densidad óptica (DO) del Control límite de corte [CO]

Calcule la media de la DO de las dos (2) mediciones del Control límite de corte (p.e. en B1/C1).

Ejemplo: $(0,44 + 0,46) / 2 = 0,45 = CO$

7.3 Interpretación

POSITIVO Los valores (media) de DO de muestra del paciente más del 10 % por encima del CO
(Media OD paciente $> 1,1 \times CO$)

ZONA GRIS Los valores (media) de DO de muestra del paciente entre el 10 % por encima o por
debajo del CO.

Repita el test 2 - 4 semanas después - con nuevas muestras del paciente
($0,9 \times CO \leq \text{Media OD paciente} \leq 1,1 \times CO$)

Si el segundo test resultara de nuevo en la zona gris \Rightarrow **NEGATIVO**

NEGATIVO Los valores (media) de DO de muestra del paciente más del 10 % por debajo del CO
(Media OD paciente $< 0,9 \times CO$)

7.3.1 Resultados en Unidades DEMEDITEC [DU]

Valor de DO (media) del paciente $\times 10 =$ [Unidades DEMEDITEC = DU]
CO

Ejemplo: $\frac{1,580 \times 10}{0,45} = 35 \text{ DU}$

Interpretación de los resultados

Límite de corte: 10 DU

Zona gris: 9 - 11 DU

Negativo: < 9 DU

Positivo: > 11 DU

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos. En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado; fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,52 - 60 DU/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

No se ha detectado reactividad cruzada con Epstein Barr Virus (VCA) IgM, Mycoplasma pneumonia IgM y Borrelia burgdorferi IgM.

9.3 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 0,52 DU/mL; ($DO_{450} = 0,025$).

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. (Detectado con el método de comparación Mikrogen ELISA, con tres lotes de ELISA de DEMEDITEC. 77 muestras, de las cuales 57 han dado como resultado negativo, se han analizado con el lote de ELISA de DEMEDITEC 1-3). Es 100% (para los tres lotes).

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. (Detectado con el método de comparación Mikrogen ELISA, con tres lotes de ELISA de DEMEDITEC. 77 muestras, de las cuales 20 han dado como resultado positivo, se han analizado con el lote DEMEDITEC 1-3). Es 100% (para los tres lotes).

Para más información sobre

9.6 Comparación de métodos

9.7 Reproducibilidad

9.8 Linealidad

consultar las instrucciones de uso en inglés.

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. Ninguna de las siguientes muestras con posible interferencia interferirá con el ELISA: Muestras con factores reumatoides, muestras que contienen hormonas del embarazo, muestras que contienen marcadores tumorales, muestras con HAMA o ANA y muestras de personas mayores con alta concentración de proteínas.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas 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 debería hacerse en base al resultado de un único test. Un diagnóstico preciso debería tener en cuenta el historial clínico, la sintomatología, así como 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 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
	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore