

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# Treponema pallidum (Syphilis) IgM ELISA



DE4267



96 Wells



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

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

1	INTRODUCTION .....	2	1	INTRODUCCIÓN .....	22
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	2	2	PROCEDIMIENTO DEL TEST .....	22
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3	3	PELIGROS Y PRECAUCIONES .....	22
4	KIT COMPONENTS .....	4	4	COMPONENTES DEL KIT .....	23
5	SPECIMEN .....	5	5	MUESTRAS .....	24
6	ASSAY PROCEDURE .....	5	6	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO .....	25
7	RESULTS .....	7	7	RESULTADOS .....	26
8	QUALITY CONTROL .....	7	8	CONTROL DE CALIDAD .....	26
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	8	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO .....	27
10	LIMITATIONS OF USE .....	8	10	LIMITACIONES DE USO .....	27
11	LEGAL ASPECTS .....	8	11	ASPECTOS LEGALES .....	27
12	REFERENCES / LITERATURE .....	8	12	BIBLIOGRAFÍA .....	27
1	EINLEITUNG .....	9		SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS .....	28
2	TESTPRINZIP .....	9		SHORT INSTRUCTIONS FOR USE .....	29
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	9			
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	10			
5	PROBENVORBEREITUNG .....	11			
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	12			
7	ERGEBNISSE .....	13			
8	QUALITÄTS-KONTROLLE .....	14			
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	14			
10	GRENZEN DES TESTES .....	14			
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	15			
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	15			
1	INTRODUZIONE .....	16			
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	16			
3	PRECAUZIONI .....	16			
4	COMPONENTI DEL KIT .....	17			
5	CAMPIONI .....	18			
6	ATTUAZIONE DEL TEST .....	18			
7	RISULTATI .....	20			
8	CONTROLLO QUALITÀ .....	20			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST .....	21			
10	LIMITAZIONI .....	21			
11	ASPETTI LEGALI .....	21			
12	BIBLIOGRAFIA .....	21			

## 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 serum.

**This assay is intended for in vitro diagnostic use only.**

### 1.2 Summary and Explanation

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

Treatment with antibiotics at the earliest disease stage and prophylactic measures are ways to prevent epidemics. For this purpose, antenatal and donor blood screenings are mandatory in most of countries around the world.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Patient samples are diluted with *Sample Diluent* and additionally incubated with *IgG-RF-Sorbent*, containing hyper-immune anti-human IgG-class antibody to eliminate competitive inhibition from specific IgG and to remove rheumatoid factors. This pretreatment avoids false negative or false positive results.

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. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microtiter plate reader.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.4 N acidic solution. 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 – 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according 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. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with Treponema pallidum antigen.  
(incl. 1 strip holder and 1 cover foil)
  2. **Sample Diluent** \* 1 vial, 100 mL, ready to use,  
colored yellow; pH  $7.2 \pm 0.2$ .
  3. **IgG-RF-Sorbent** \*, 1 vial, 6.5 mL, ready to use,  
colored yellow;  
Contains anti-human IgG-class antibody.
  4. **Pos. Control** \*, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;  
colored yellow, red cap.
  5. **Neg. Control** \*, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;  
colored yellow, yellow cap.
  6. **Cut-off Control** \*, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;  
colored yellow, black cap.
  7. **Enzyme Conjugate** \*, 1 vial, 20 mL, ready to use,  
colored red,  
antibody to human IgM conjugated to horseradish peroxidase.
  8. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
  9. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 0.4 N acidic solution,  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
  10. **Wash Solution** \*, 1 vial, 30 mL (20X concentrated for 600 mL), pH  $6.5 \pm 0.1$   
see „Preparation of Reagents“.
- \* contain non-mercury preservative

#### 4.1.1 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450/620nm  $\pm 10$  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 two months if stored as described above.

### 4.3 Reagent Preparation

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

#### **Wash Solution**

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

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 can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

#### 5.1 Specimen Collection

##### Serum:

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

#### 5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

#### 5.3 Specimen Dilution

Prior to assaying 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 for at least 15 minutes at room temperature or overnight at 2 °C to 8 °C 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
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- During incubation cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.

## 6.2 Test Procedure

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

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

2. Dispense
  - 100 µL** of *Neg. Control* into well B1
  - 100 µL** of *Cut-off Control* into wells C1 and D1
  - 100 µL** of *Pos. Control* into well E1 and
  - 100 µL** of each pre-treated sample with new disposable tips into appropriate wells.
 Leave well A1 for substrate blank!
3. Cover wells with foil supplied in the kit. Incubate for **60 minutes at 37 °C**.
4. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (**300 µL per well**). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well, **except A1**.
6. Incubate for **30 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C)**.  
*Do not expose to direct sun light!*
7. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
8. Add **100 µL** of *Substrate Solution* into all wells.
9. Incubate for **exactly 15 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C) in the dark**.
10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.  
Any blue color developed during the incubation turns into yellow.  
**Note:** Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen!
11. Read the optical density at **450/620 nm** with a microtiter plate reader **within 30 minutes** after adding the *Stop Solution*.

## 6.3 Measurement

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

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

**Measure the absorbance** of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

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

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

## 7 RESULTS

### 7.1 Validation of the Test Run

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

<b>Substrate blank in A1:</b>	Absorbance value <b>lower than 0.100</b>
<b>Neg. Control in B1:</b>	Absorbance value <b>lower than 0.200</b>
<b>Cut-off Control in C1/D1 :</b>	Absorbance value <b>between 0.350 - 0.800</b>
<b>Pos. Control in E1:</b>	Absorbance value <b>between 0.650 - 3.000</b>

### 7.2 Calculation

#### Mean absorbance value of Cut-off Control [CO]

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

**Example:**  $(0.44 + 0.46) : 2 = 0.45 = CO$

### 7.3 Interpretation

**POSITIVE** Patient (mean) absorbance values more than 10 % above CO  
(Mean OD<sub>patient</sub> > 1.1 x CO)

**GREY ZONE** Patient (mean) absorbance values from 10 % above to 10 % below CO  
repeat test 2 - 4 weeks later - with new patient samples  
(0.9 x CO ≤ Mean OD<sub>patient</sub> ≤ 1.1 x CO)

Results in the second test again in the grey zone ⇒ **NEGATIVE**

**NEGATIVE** Patient (mean) absorbance values more than 10 % below CO  
(Mean OD<sub>patient</sub> < 0.9 x CO)

#### 7.3.1 Results in DEMEDITEC Units [DU]

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

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 Diagnostic Specificity**

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is 95 %.

### **9.2 Diagnostic Sensitivity**

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is 95 %.

## **10 LIMITATIONS OF USE**

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

## **11 LEGAL ASPECTS**

### **11.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

### **11.2 Therapeutic Consequences**

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### **11.3 Liability**

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## **12 REFERENCES / LITERATURE**

1. 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. *Wsch. Klein. Wsch.* 95: 440-443

## 1 EINLEITUNG

Der **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM ELISA** wird zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Treponema pallidum in Humanserum eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay.

In einem dem Testablauf vorangehenden vorbereitenden Schritt werden die Patientenproben mit *Sample Diluent* verdünnt und zusätzlich mit *IgG-RF-Sorbent* inkubiert.

Durch die Verwendung von Anti-human-IgG-Antikörpern im *IgG-RF-Sorbent* werden gleichzeitig hemmende kompetitive Bindungen durch spezifische IgG-Antikörper und Rheumafaktoren verhindert. Diese Probenvorbereitung verhindert falsch positive oder negative Ergebnisse.

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit Treponema pallidum-Antigen beschichtet. In diese Vertiefungen werden **vorbehandelte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert.

Während der darauf folgenden Inkubation werden Treponema pallidum-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden.

Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-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 Extinktionsmessung bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- 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 0,4 N saure Lösung 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 DEMEDIATEC Diagnostics GmbH erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen den EU-Verordnungen

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit Treponema pallidum-Antigen beschichtet;  
(inkl. 1 Streifenhalter und 1 Abdeckfolie)
2. **Sample Diluent** \* (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt; pH 7,2 ± 0,2.
3. **IgG-RF-Sorbent** \*, 1 vial, 6.5 mL, gebrauchsfertig,  
gelb gefärbt;  
Enthält anti-human IgG-Antikörper.
4. **Pos. Control** \* (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt, rote Kappe.
5. **Neg. Control** \* (Negative Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt, gelbe Kappe.
6. **Cut-off Control** \* (Grenzwert-Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;  
gelb gefärbt, schwarze Kappe.
7. **Enzyme Conjugate** \* (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;  
rot gefärbt.  
Antikörper gegen humanes IgM, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
8. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Tetramethylbenzidin (TMB).
9. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 0,4 N saure Lösung;  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
10. **Wash Solution** \* (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, (**20X** konzentriert für 600 mL) pH 6,5 ± 0,1;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

\* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel

#### 4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

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

### 4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die *Microtiterwells* sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

### 4.3 Vorbereitung der Reagenzien

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

#### **Wash Solution**

Waschlösung **1 + 19** (z.B. 10 mL + 190 mL) mit frischem, keimfreiem destilliertem Wasser verdünnen. Diese verdünnte Waschlösung hat einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2.

Bedarf: ca. 5 mL pro Bestimmung.

Kristalle in der Lösung durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C auflösen. Es muss sichergestellt sein, dass die Kristalle vollständig gelöst sind, bevor die Waschlösung verwendet wird.

Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C bis 8 °C für 2 Wochen stabil.

#### 4.4 Entsorgung des Kits

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

#### 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 kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

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

#### 5.1 Probenentnahme

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

#### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tagen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren, bei -20 °C, bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

#### 5.3 Probenverdünnung

Vor Testbeginn 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. **15 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 2 °C bis 8 °C stehen lassen, danach nochmals gut mischen.**
5. 100 µL dieser vorverdünnten 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 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 den Substratleerwert (Blank),	
1 Vertiefung	(z.B. B1)	für die <i>Neg. Control</i>	
2 Vertiefungen	(z.B. C1 + D1)	für die <i>Cut-off Control</i>	und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die <i>Pos. Control</i>	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 B1 je  
**100 µL *Cut-off Control*** in die Vertiefungen C1 und D1  
**100 µL *Pos. Control*** in Vertiefung E1 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.  
 Vertiefung A1 für den Substratleerwert (Blank) reservieren!
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 Waschschruttes!
5. **100 µL *Enzyme-Conjugate*** in jede Vertiefung geben, **außer in A1**.
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

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

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

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

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

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

## 7 ERGEBNISSE

### 7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

<b>Substrat-Leerwert in A1:</b>	Extinktion <b>niedriger als 0,100</b>
<b>Neg. Control in B1:</b>	Extinktion <b>niedriger als 0,200</b>
<b>Cut-off Control in C1 und D1:</b>	Extinktionen <b>zwischen 0,350 - 0,800</b>
<b>Pos. Control in E1:</b>	Extinktion <b>zwischen 0,650 - 3,000</b>

### 7.2 Testauswertung

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

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

**Beispiel:**  $(0.44 + 0.46) : 2 = 0.45 = CO$

### 7.3 Interpretation

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

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

Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone  $\Rightarrow$  **NEGATIV**.

**NEGATIV** Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10 % unterhalb des CO  
(Mittlere OD Probe < 0.9 x CO)

#### 7.3.1 Ergebnisse in DEMEDITEC Units [DU]

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

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 QUALITÄTS-KONTROLLE**

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 CHARACTERISTIKA**

### **9.1 Diagnostische Spezifität**

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

Sie beträgt 95 %.

### **9.2 Diagnostische Sensitivität**

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

Sie beträgt 95 %.

## **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.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## **12 REFERENZEN / LITERATUR**

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



## 1 INTRODUZIONE

L'immunoassay enzimatico **DEMEDIATEC Treponema pallidum IgM** fornisce materiale per la determinazione **qualitativa** e **semiquantitativa** di anticorpi della classe IgM per *Treponema pallidum* nel siero.

**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.

I campioni dei pazienti sono diluiti con il *Sample Diluent* e poi incubati con *IgG-RF-Sorbent*, contenente anticorpi IgG anti-umani ed iper-immuni per eliminare l'inibizione competitiva da parte di IgG specifici e per rimuovere fattori reumatici.

Questo pre-trattamento evita dei risultati falsamente positivi o negativi.

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 sulfidrico.

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'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.4 N acido soluzione. L'acido soluzione 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 magazzinati 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. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti  
Pozzetti ricoperti con Treponema pallidum antigene,  
(include 1 supporto per pozzetti e 1 foglio di copertura)
  2. **Sample Diluent** \* (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso,  
colore giallo; pH  $7.2 \pm 0.2$ .
  3. **IgG-RF-Sorbent** \* (Assorbente IgG-RF), 1 flacone, 6.5 mL, pronto all'uso,  
colorato giallo;  
Contiene anticorpi della class IgG anti-umano.
  4. **Pos. Control** \* (Controllo positivo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;  
colore giallo, tappo rosso.
  5. **Neg. Control** \* (Controllo negativo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;  
colore giallo, tappo giallo.
  6. **Cut-off Control** \* (Controllo valore limite), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;  
colore giallo, tappo nero.
  7. **Enzyme Coniugate** \* (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso;  
colore rosso,  
anticorpo a IgM umano coniugato alla perossidasi di rafano.
  8. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso  
TMB (benzidine tetrametilico).
  9. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
contiene 0.4 N acido soluzione  
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
  10. **Wash Solution** \* (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (20 X concentrato per 600 mL),  
pH  $6.5 \pm 0.1$   
vedi „Preparazione dei reagenti“.
- \* Contiene conservante senza mercurio

#### 4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti ( $450 \pm 10$  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 due mesi se magazzinati come descritto sopra.

### 4.3 Preparazione dei reagenti

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

#### **Wash Solution**

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

Consumo: ~ 5 mL per determinazione.

I cristalli nella soluzione si sciolgono durante il riscaldamento a 37 °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 può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

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

#### 5.1 Collezione dei campioni

##### Siero:

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

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

#### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni da 2 °C a 8 °C prima dell'utilizzo. Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

#### 5.3 Diluizione dei campioni

Prima dell'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. **Far riposare per 15 minuti a temperatura ambiente o per tutta la notte a 2 °C a 8 °C, in seguito rimescolare accuratamente.**
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 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 bianco,	
1 pozzetto (p.es. B1)	per il <i>Neg. Control</i>	
2 pozzetti (p.es. C1 D1)	per il <i>Neg. Control</i>	e
1 pozzetto (p.es. D1)	per il <i>Pos. Control</i> .	

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

2. Aggiungere
  - 100 µL** del *Neg. Control* nei pozzetto B1
  - 100 µL** del *Cut-off Control* nei pozzetti C1 + D1
  - 100 µL** del *Pos. Control* nel pozzetto E1 e
  - 100 µL** di ogni campione pretrattati con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.
 Lasciare il pozzetto A1 vuoto per il bianco!
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, **eccetto A1**.
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

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

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

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e riportare i valori di tutti i campioni e controlli del piano di distribuzione ed identificazione.

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

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

## 7 RISULTATI

### 7.1 Convalidazione del test

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

**Valor bianco in A1:** Assorbanza **inferiore a 0.100**

**Neg. Control in B1:** Assorbanza **inferiore a 0.200**

**Cut-off Control in C1/D1:** Valor di assorbanza **tra 0.350 - 0.800**

**Pos. Control in E1:** Valor di assorbanza **tra 0.650 - 3.000**

### 7.2 Calcolo

#### Il valore medio del Controllo valore limite [CO]

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

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

### 7.3 Interpretazione

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

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

Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia  $\Rightarrow$  **NEGATIVI**

**NEGATIVI** Valori (medi) di assorbanza almeno 10 % inferiore a CO  
(Medio  $DO_{paziente} < 0.9 \times CO$ )

#### 7.3.1 Risultati in unità DEMEDITEC [DU]

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

**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 Specificità diagnostica**

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

È 95 %.

### **9.2 Sensitività diagnostica**

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

È 95 %.

## **10 LIMITAZIONI**

Contaminazioni batteriche o ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni possono influenzare i valori di assorbanza.

Per pazienti immunosoppressi e per neonati i dati sierologici hanno una validità ristretta.

## **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 simptomatologia e i dati sierologici. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

### **11.3 Responsabilità legali**

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

## **12 BIBLIOGRAFIA**

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 1 INTRODUCCIÓN

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. **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).

Las muestras de pacientes se diluyen con Diluyente de la muestra (*Sample Diluent*) y adicionalmente, se incuban con un Sorbente para eliminar IgG-factores reumatoides (*IgG-RF-Sorbent*), que contiene un anticuerpo hiperinmune tipo IgG anti-humano para eliminar la inhibición competitiva de IgG específica y para descartar factores reumatoides. Este pretratamiento evita falsos negativos o falsos positivos en el resultado final.

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 0.4 N ácido solución. 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 (21 °C - 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. **Placas de microtitulación**, 12 x 8 tiras (desechables), 96 pocillos; Pocillos recubiertos con antígeno de *Treponema pallidum*. (incl. 1 soporte para las tiras y 1 lámina autoadhesiva como cubierta)
2. **Sample Diluent** (*Diluyente de la muestra*) \* 1 vial, 100 mL, listo para usar, coloración amarilla; pH 7.2 ± 0.2.
3. **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. **Pos. Control** (*Control positivo*) \*, 1 vial, 2,0 mL, listo para usar, coloración amarilla, tapa roja.
5. **Neg. Control** (*Control negativo*) \*, 1 vial, 2,0 mL, listo para usar, coloración amarilla, tapa amarilla.
6. **Cut-off Control** (*Control límite de corte*) \*, 1 vial, 2,0 mL, listo para usar, coloración amarilla, tapa negra.
7. **Enzyme Conjugate** (*Conjugado enzimático*) \*, 1 vial, 20 mL, listo para usar, coloración roja, anticuerpo anti-IgM humana conjugado con peroxidasa de rábano.
8. **Substrate Solution** (*Solución sustrato*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbenzidina (TMB).
9. **Stop Solution** (*Solución stop*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.4 N ácido solución. Evite el contacto con la solución stop. Puede causar irritación en la piel y quemaduras.
10. **Wash Solution** (*Solución de lavado*) \*, 1 vial, 30 mL (concentrada 20X para volumen final de 600 mL), pH 6,5 ± 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 dos meses 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

Suero puede ser utilizado en este ensayo.

No use muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas.

### 5.1 Colección de muestras

**Suero:**

Tome una muestra de sangre por venopunción (p.e. Sarstedt Monovette para suero), deje que coagule, y separe el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugue hasta que la coagulación sea completa. Pacientes recibiendo terapia anticoagulante pueden necesitar más tiempo de coagulación.

### 5.2 Almacenamiento de muestras

Las muestras han de ser almacenadas tapadas y pueden conservarse hasta durante 5 días a 2 °C - 8 °C antes de hacer el test.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a - 20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes de comenzar el test.

### 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 diluidas 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 prediluida **1+1** con el Sorbente para eliminar IgG-factores reumatoides (*IgG-RF-Sorbent*) p.e. 60 µL de muestra prediluida + 60 µL de *IgG-RF-Sorbent*. **Mezclar bien.**
4. **Deje la muestra durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente o durante la noche a 2 °C - 8 °C y mezcle bien de nuevo.**
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, pipetee las muestras del paciente y aplique el conjugado cuidadosamente en el fondo de los pocillos.
- Durante la incubación cubra las tiras de la placa de microtitulación con lámina autoadhesiva para evitar la evaporación del contenido de los pocillos.

### 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 la blanco de solución sustrato,	
1 pocillo	(p.e. B1)	para el Control negativo,	
2 pocillos	(p.e. C1+D1)	para el Control límite de corte ( <i>Cut-off Control</i> )	y
1 pocillo	(p.e. E1)	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
 

<b>100 µL</b>	del Control negativo ( <i>Neg. Control</i> )	en el pocillo B1	
<b>100 µL</b>	del Control límite de corte ( <i>Cut-off Control</i> )	en los pocillos C1 y D1	
<b>100 µL</b>	del Control positivo ( <i>Pos. Control</i> )	en el pocillo E1	y

**100 µL** de cada muestra pretratada con puntas de pipeta nuevas en los pocillos apropiados.  
 ¡Reserve el pocillo A1 para el blanco de solución sustrato!.
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, **excepto en el A1**.
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

**Ajuste** el lector de microplacas ELISA a **cero** utilizando el blanco con **Solución sustrato** (*Substrate Solution*) en el pocillo A1.

Si - debido a motivos técnicos - el lector de microplacas ELISA no puede ajustarse a cero usando la Solución sustrato (*Substrate Solution*) en el pocillo A1, reste el valor de absorbancia del pocillo A1 de los valores de absorbancia de los otros pocillos para obtener resultados fiables.

**Mida la absorbancia de todos los pocillos a 450 nm** y anote los valores de absorbancia 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 absorbancia** de todos los duplicados.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Validación de la prueba

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

<b>Blanco de solución sustrato en A1:</b>	Absorbancia <b>menor de 0.100</b>
<b>Control negativo en B1:</b>	Absorbancia <b>menor de 0.200</b>
<b>Control límite de corte en C1/D1:</b>	Absorbancia <b>entre 0.350 – 0.800</b>
<b>Control positivo en E1:</b>	Absorbancia <b>entre 0.650 – 3.000</b>

### 7.2 Cálculo

#### Absorbancia media del Control límite de corte [CO]

Calcule la media de la absorbancia de las dos (2) mediciones del **Control límite de corte** (p.e. en C1/D1).

**Ejemplo:**  $(0,44 + 0,46) : 2 = 0.45 = CO$

### 7.3 Interpretación

**POSITIVO** Absorbancia (media) de muestra del paciente más del 10 % por encima del CO  
(Media OD paciente  $> 1.1 \times CO$ )

**ZONA GRIS** Absorbancia (media) 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** Absorbancia (media) 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]

Absorbancia media del paciente  $\times 10 =$  [Unidades DEMEDITEC = DU]

**Ejemplo:**  $\frac{CO}{0.45} \times 10 = 35 DU$

#### 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 Especificidad diagnóstica**

La especificidad diagnóstica se define como la probabilidad de que el test resulte negativo cuando el analito específico no se encuentre presente en la muestra.  
Es del 95 %.

### **9.2 Sensibilidad diagnóstica**

La sensibilidad diagnóstica se define como la probabilidad de que el test resulte positivo cuando el analito específico se encuentre presente en la muestra.  
Es del 95 %.

## **10 LIMITACIONES DE USO**

La contaminación bacteriana o repetidos ciclos de congelación-descongelación de las muestras pueden afectar los valores de absorbancia.  
Los datos serológicos tienen solo un valor limitado en pacientes inmunocomprometidos y en recién nacidos.

## **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.














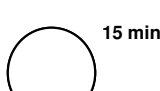


## **12 BIBLIOGRAFÍA**

Consultar el manual de usuario en inglés.

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS**

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	Para uso 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
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Pos. Control</i>	Positive Control	Positive Kontrolle	Positif Contrôle	Control positivo	Controllo positivo
<i>Neg. Control</i>	Negative Control	Negative Kontrolle	Négatif Contrôle	Control negativo	Controllo negativo
<i>Cut-off Control</i>	Cut-off Control	Grenzwert-Kontrolle	Valeur limite Contrôle	Control valor limite	Controllo valore limite
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>IgG-RF-Sorbent</i>	Rheumatoid factor-Absorbent	Rheumafaktor-absorbens			Assorbente IgG-RF
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante

## SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25 °C) before use.
	Leave well A1 for substrate Blank. Dispense 100 µl of Controls into appropriate wells.
	Dispense 100 µl of sample into selected wells. <b>(Please note special sample treatment, point 5.3!)</b>
	Cover wells with foil. Incubate for <b>60 minutes</b> at 37 °C.
	Briskly shake out the contents of the wells.
	Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µl per well).
	Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
	Dispense 100 µl of Enzyme-Conjugate into each well.
	Incubate for <b>30 minutes</b> at room temperature.
	Briskly shake out the contents of the wells.
	Rinse the wells 5 times with diluted Wash Solution (300 µl per well).
	Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
	Add 100 µl of Substrate Solution to each well.
	Incubate for <b>15 minutes</b> at room temperature.
	Stop the reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
	Determine the absorbance of each well at 450 nm.