ENZY-WELL

TREPONEMA IgM

REF 91051 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Κατασκευάζεται από/
Fabricado por/ Fabriqué par:
DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy

	Capitolo **Section** **Capítulo**
Modifiche introdotte nella revisione corrente **Changes introduced in the current revision** **Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση** **Cambios introducidos en la revisión actual** **Modifications apportées à la révision courante**	**13 – 14**

CE

INDICE / INDEX / ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / /ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE /ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES
15. PRECISIONE / PRECISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / "ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZY-WELL
TREPONEMA IgM

REF 91051 **(Italiano)**

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI TREPONEMA PALLIDUM NEL SIERO UMANO.

2. INTRODUZIONE

La diagnosi sierologica della Sifilide si effettua stabilendo se ci sono nel siero del paziente anticorpi, a titolo significativo, specifici per il Treponema Pallidum. Il metodo di riferimento è l'FTA-ABS che consente di rivelare sia le IgG che le IgM. Poiché l'esecuzione è laboriosa e l'interpretazione del test non è agevole, si sono trovati metodi alternativi in grado di semplificare la procedura. L'ELISA fornisce risultati riproducibili e specifici in completa automazione e per questo motivo è proposta da molti utilizzatori.
Molto importante risulta il dosaggio specifico delle IgM divise dalle IgG in quanto aiuta nella diagnosi di Sifilide congenita.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle IgM anti Treponema pallidum si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline e successiva rivelazione di quelle specifiche sfruttando la loro capacità di legare un antigene coniugato a perossidasi.
La cattura si effettua con anticorpi monoclonali legati alla fase solida (pozzetti di microtiter). L'antigene è costituito da una miscela di proteine ricombinanti purificate del Treponema pallidum, marcate con perossidasi.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12 x 8 pozzetti sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.
Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (MM seguita dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL
Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.
Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT OFF 1x2.5 mL
Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.
Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL
Contenuto: Proteine ricombinanti purificate del Treponema pallidum, coniugate con perossidasi, in soluzione di tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.
Preparazione: pronto all'uso.

CONTROL IgM - IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1x100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, disciogliерli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Da utilizzare per la diluizione dei campioni.
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) contenente proteine 10% p/v e sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H_2O_2 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
Soluzione di H_2SO_4 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).
BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO
- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 nm o 450/620 nm, con linearità fino ad OD ≥ 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi da 225-375 µL
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.
La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	**CONDIZIONI**
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla data di scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla data di scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla data di scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C

Attenzione:
Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.

2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
   a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
   b) Il coniugato contiene fenolo
   c) Il substrato è acido
   d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

   Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulito, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**

   Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare l'uso di congelatori autosbrinanti per la conservazione dei campioni.
8. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
9. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
10. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
11. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
12. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
13. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
14. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
    - installazione e requisiti particolari
    - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
    - specifiche del produttore e performance dello strumento
    - manutenzione e assistenza tecnica

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a –20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del

dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.
Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.
Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Diluire i campioni 1:51 dispensando 20 µL di siero in 1 mL di diluente; distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.
Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µL) si aggiungono 100 µL di coniugato (proteine ricombinanti purificate del Treponema pallidum marcate con perossidasi) per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

STEP 1 Mettere 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip.
-
Incubare 45 min. a 37°C
-
Lavare 4 volte (300 µL)
-
STEP 2 Mettere 100 µL di tracciante per pozzetto
-
Incubare 45 min. a 37°C
-
Lavare 4 volte (300 µL)
-
STEP 3 Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
-
Incubare 15 min. a t.a.
-
STEP 4 Aggiungere 100 µL di Stop Solution
-
Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.150) a tutte le altre letture.
I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere ≤ 0.6. La D.O. del cut-off deve essere ≥ 0,2 a 450 nm e ≥ 0,16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.
Calcolare il rapporto fra il valore medio delle O.D. del campione in esame e quello del Cut-off.
Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2.
Dubbio: = ± 20% del Cut-off.
Negativo: quando il rapporto è < 0.8.

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I risultati di questo test devono essere interpretati insieme ad altri dati clinici e di laboratorio.
Come nel caso della risposta in IgM in altre malattie infettive, una piccola percentuale di pazienti sifilitici possono presentare bassi livelli di IgM anti-T. pallidum, anche dopo il normale periodo massimo di 1-2 anni.
In casi sospetti di sifilide molto precoce, nei quali il test potrebbe risultare negativo, tali pazienti devono essere nuovamente sottoposti al test dopo una settimana circa.

13. SPECIFICITÀ ANALITICA

Sono stati testati campioni contenenti potenziali interferenti:
- Campioni altamente emolizzati (n = 3)
- Fattore Reumatoide (fino a 1048 UI/ml) (n = 5)
- Bilirubina (fino a 11 mg/dl) (n = 5)
- Trigliceridi (fino a 1281 mg/dl) (n = 4).

In nessun caso il kit Enzywell Treponema IgM veniva influenzato dal campione.

10 campioni, positivi a Borrelia sono stati testati.
Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

In una sperimentazione sono stati analizzati 148 campioni con il kit Diesse e con un altro kit del commercio.
Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	**-**	**Totale**
Diesse	+	36	0	36
	-	0	112	112
	Totale	36	112	148

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica): 100% ($CI_{95\%}$: 90.3-99.9)
Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica): 100% ($CI_{95\%}$: 96.7-100)

15. PRECISIONE

Precisione nella prova

	TPM1	TPM2	TPM3	Cut off	Controllo Positivo
N =	24	24	24	12	12
D.O.	0.22	0.50	1.45	0.29	2.49
CV%	19	5	5	2	4

Precisione entro prove

	INDEX	
Campione	Media	CV%
TPM3	4.1	11
TPM2	1.5	16
TPM1	0.7	16
Controllo Positivo	7.5	8

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	**POSSIBLI FONTI DI ERRORE**	**AZIONI DA INTRAPRENDERE**
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.

Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S.A. Lukehart et al. Characterization of monoclonal antibodies to Treponema Pallidum. J. Immunology 134: 585 (1985).
3. S.A. Lukehart: Identification and characterization of Treponema Pallidum antigens by monoclonal antibodies. in: Monoclonal Antibodies, Academic Press 1986, p. 1.
4. L. Lewis et al.: Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 28: 296 (1990).
5. M. Norgard et al.: Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of Treponema Pallidum Nichols in the diagnosis of syphilis. J. Clin. Microbiol. 20: 711 (1984).
6. M.J. Bailey et al.: Production of murine monoclonal antibodies to the major axial filament polypeptide of Treponema pallidum. J. Gen. Microbiol. 133: 1805 (1987).

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL
TREPONEMA IgM

REF **91051** **(English)**

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO TREPONEMA PALLIDUM IN HUMAN SERUM.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The serological diagnosis of Syphilis is performed by demonstrating the presence of significant levels of specific antibodies for Treponema pallidum in the patient's serum.
The reference method used is the FTA-ABS technique which allows the detection of both IgG and IgM. However, its execution is laborious and the interpretation of the results is not simple; alternative methods have therefore been found to simplify the procedure. ELISA gives completely automated, reproducible and specific results, and for this reason is proposed by many operators. The specific assay of IgM as opposed to IgG is of great importance in the diagnosis of congenital Syphilis.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test for the assay of Treponema pallidum IgM is based on the principle of the capture of these immunoglobulins and the subsequent identification of those which are specific, making use of their ability to bind an antigen conjugated to peroxidase. The capture is performed using monoclonal antibodies bound to the solid phase (microtiter wells). The antigen is composed of purified recombinant proteins of Treponema Pallidum, labelled with peroxidase (1-6).

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells *c*oated with anti-human IgM monoclonal antibodies.
Use: open the package at the opposite end from the code (MM followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1x1.6 mL
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.
Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT-OFF CUT OFF CONTROL 1x2.5 mL
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.
Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

CONJ CONJUGATE 1x16 mL
Contents: Purified recombinant proteins of Treponema pallidum conjugated to peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.
Preparation: ready for use.

CONTROL IgM - IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.
Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 10 DILUENT 10 (PF93621) 1x100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
To be used to dilute samples.
Contents: PBS containing proteins 10% w/v and sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
H_2SO_4 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).
POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED
- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µL solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.
The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Controls	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

Caution:
This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin. Waste disposal: the used devices containing materials of human origin must be handled as infectious material and disposed of according to the full requirements of this issue.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
   a) The Wash Buffer contains detergents
   b) The conjugate contains phenol
   c) The substrate is acid
   d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

   If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Soution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature**.**
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents sbould be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Avoid to use self-defrosting freezers for the storage of the samples.
8. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for excusive use with the various reagents.
9. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
10. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO_2 incubators must not be used.
11. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
12. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
13. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
14. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
    - installation and particular requisites
    - operating principles, instructions, precautions and risks
    - manufacturer's specifications and instrument performance
    - servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at –20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted

samples must be carefully shaken before performing the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.
Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.
The test cannot be performed on human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Dilute samples 1:51 distributing 20 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.
Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), add 100 µL of the conjugate (purified recombinant proteins of Treponema pallidum conjugated to peroxidase) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film.
The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.
After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.
The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample//controls in the wells of the strips.
-
Incubate for 45 min. at 37°C
-
Wash 4 times (300 µL)
-
STEP 2 Add 100 µL of tracer to each well
-
Incubate for 45 min. at 37°C
-
Wash 4 times (300 µL)
-
STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well
-
Incubate for 15 min. at R.T.
-
STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution
-
Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. VALIDATION OF THE TEST

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum must be within 25% of the mean value. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6. The O.D. of the cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-off, the sample is positive for the presence of specific IgM.
Calculate the ratio between the average O.D. value of the sample and that of the Cut-off.
The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2.
Doubtful: ± 20% of the Cut-off.
Negative: if the ratio is < 0.8.

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The results of this test should be interpreted in conjunction with other clinical and laboratory data.
As in the IgM response in other infectious diseases, a small number of Syphilis patients may present persistent low levels of IgM to T. pallidum even after the normal maximum period of 1-2 years.
In cases of suspected very early Syphilis in which the test may result negative, these patients should be retested about 1 week later.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

The following samples were tested containing potentially interfering substances:
- Highly hemolyzed samples (n = 3)
- Rheumatoid Factor (up to 1048 IU/ml) (n = 5)
- Bilirubin (up to 11 mg/dl) (n = 5)
- Triglycerides (up to 1281 mg/dl) (n = 4).

In no case was the result of the Enzywell Treponema IgM test influenced by the type of sample.

10 samples, positive to Borrelia were tested.
No significant cross-reactions were found.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In an experimentation 148 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit.
Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	**-**	**Total**
Diesse	+	36	0	36
	-	0	112	112
	Total	36	112	148

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity): 100% ($CI_{95\%}$: 90.3-99.9)
Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity): 100% ($CI_{95\%}$: 96.7-100)

15. PRECISION

In-run Precision

	TPM1	TPM2	TPM3	Cut off	Positive Control
N =	24	24	24	12	12
O.D.	0.22	0.50	1.45	0.29	2.49
CV%	19	5	5	2	4

Between-run Precision

INDEX

Sample	Average	CV%
TPM3	4.1	11
TPM2	1.5	16
TPM1	0.7	16
Positive Control	7.5	8

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	**POSSIBLE SOURCE**	**TEST OR ACTION**
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see instructions for use point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow). Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well

Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S.A. Lukehart et al. Characterization of monoclonal antibodies to Treponema Pallidum. J. Immunology 134: 585 (1985).
3. S.A. Lukehart: Identification and characterization of Treponema Pallidum antigens by monoclonal antibodies. in: Monoclonal Antibodies, Academic Press 1986, p. 1.
4. L. Lewis et al.: Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 28: 296 (1990).
5. M. Norgard et al.: Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of Treponema Pallidum Nichols in the diagnosis of syphilis. J. Clin. Microbiol. 20: 711 (1984).
6. M.J. Bailey et al.: Production of murine monoclonal antibodies to the major axial filament polypeptide of Treponema pallidum. J. Gen. Microbiol. 133: 1805 (1987).

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZY-WELL
ΣΠΕΙΡΟΧΑΙΤΗ IgM

REF **91051** **(Ελληνικά)**

1. ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΑΤΙΚΟ ΚΙΤ ΣΥΛΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgM ΑΝΤΙ-ΩΧΡΗΣ ΣΠΕΙΡΟΧΑΙΤΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέσω του ορού διάγνωση της Σύφιλης γίνεται με την διαπίστωση ύπαρξης, στον ορό του ασθενή, ενδεικτικής ποσότητας ειδικών αντισωμάτων της Ωχρής Σπειροχαίτης. Η μέθοδος αναφοράς είναι η FTA-ABS που επιτρέπει την ανίχνευση τόσο των IgG όσο και των IgM. Επειδή η εκτέλεση του τεστ είναι δύσκολη και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν είναι τόσο εύκολη, επινοήθηκαν εναλλακτικοί μέθοδοι για τη διευκόλυνση της όλης διαδικασίας. Η ELISA παρέχει αναπαραγώγιμα και ειδικά αποτελέσματα με εντελώς αυτόματο τρόπο, και γι' αυτό τον λόγο συστήνεται από πολλούς χρήστες.
Σημαντική αποδεικνύεται η ειδική ποσολογία των IgM απομονωμένων από τις IgG γιατί βοηθά στη διάγνωση της συγγενούς Σύφιλης.

3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΡΧΗ

Το τεστ για την ποσοτική αναλογία των IgM αντί-Ωχρής Σπειροχαίτης, βασίζεται στην αρχή της σύλληψης αυτών των ανοσοσφαιρίνων και την μετέπειτα ανίχνευσή τους εκμεταλλευόμενοι την ικανότητά τους να συνενώνονται με ένα αντιγόνο σε σύζευξη με υπεροξιδάση.
Η σύλληψη γίνεται με μονοκλωνικά αντισώματα συνενωμένα στη στερεή μορφή (βοθρία από microtiter). Το αντιγόνο αποτελείται από ένα μείγμα ανασυνδυασμένων κεκαθαρμένων πρωτεϊνών της Ωχρής Σπειροχαίτης, προσημειωμένες με υπεροξιδάση.

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ 12x8 βοθρίων που έχουν ευαισθητοποιηθεί με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντί-IgM.
Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα από την αντίθετη μεριά που βρίσκεται ο κωδικός (δύο ΜΜ που ακολουθούνται από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την εξακρίβωση της προέλευσής της. Πάρτε τη βάση και μόνο τις απαραίτητες για τα τεστ ταινίες. Τοποθετήστε τις υπόλοιπες στην σακούλα από πολυαιθυλένιο που έχει μέσα ζελέ πυριτίου, αφαιρέστε τον αέρα και κλείστε την ερμητικά.

CONTROL + ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1x1.6 mL
Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός αραιωμένος,, σε διάλυμα φωσφορικού άλατος 0.01 mol/L που περιέχει BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς να χρειάζεται περισσότερο αραίωμα.
Χρώμα: ο χρωματισμός είναι ευθέως ανάλογος του αριθμού των αντισωμάτων.

CONTROL CUT-OFF ΕΛΕΓΧΟΣ CUT-OFF 1x2.5 mL
Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός αραιωμένος,, σε διάλυμα φωσφορικού άλατος 0.01 mol/L που περιέχει BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς να χρειάζεται περισσότερο αραίωμα.
Χρώμα: ο χρωματισμός είναι ευθέως ανάλογος του αριθμού των αντισωμάτων.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1x16 mL
Περιεχόμενο: Ανασυνδυασμένες κεκαθαρμένες πρωτεΐνες της Ωχρής Σπειροχαίτης, σε σύζευξη με υπεροξιδάση σε διάλυμα φωσφορικού άλατος με περιεκτικότητα φαινόλης 0,05% και Bronidox 0,02%.
Παρασκευή: Έτοιμο για χρήση.

CONTROL IgM - ΟΠΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgM (PF93900) 1x1.6 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός αραιωμένος σε διάλυμα φωσφορικού άλατος 0.01 mol/L που περιέχει BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς να χρειάζεται περισσότερο αραίωμα.

WASH BUF 10x ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1x100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Αλατούχο διάλυμα (PBS), συμπυκνωμένο 10 φορές, περιέχον Brij 0.5% .
Παρασκευή: Αραιώστε την απαιτούμενη ποσότητα σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε ένα διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Διαλύστε τους τυχόν κρυστάλλους στους 37°C πριν προχωρήσετε στο αραίωμα.

SAMP DIL 10 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 10 (PF93611) 1x100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Χρησιμοποιείται για την αραίωση των δειγμάτων.
Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες,, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x12 mL Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Περιεχόμενο: Τετραμεθυλοβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H_2O_2 0,01% σταθεροποιημένη σε κιτρικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1x16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**
Διάλυμα H_2SO_4 0,3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑ (2).
ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΥΛΙΚΑ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ
- Επωαστήρας στους 37°C
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm, με γραμμικότητα μέχρι OD ≥ 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλάκας (όχι απαραίτητη) ικανότητας 225-375 µL
- Αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Υάλινα υλικά καθημερινής χρήσης (δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.)
- Βαθμολογημένοι σωλήνες (πιπέτες) που μπορούν να αναρροφήσουν 10, 100, 1000 µL διαλύματος
- Γάντια μιας χρήσης
- Χρονόμετρα
- Διάλυμα σε 5% υποχλωριώδους νατρίου.
- Δοχεία για τη διάθεση των δυνητικά μολυσματικών υλικών
- Απορροφητικό χαρτί

5. ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8/°C
Η ημερομηνία λήξης αναγράφεται ξεχωριστά πάνω σε κάθε αντιδραστήριο και έξω από κάθε συσκευασία.

Τα αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη σταθερότητα μετά από το άνοιγμά τους ή/και την παρασκευή τους

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ	5 εβδομάδες στους 2/8°C σακούλα από πολυαιθυλένιο
ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ	5 εβδομάδες στους 2/8°C
ΣΥΖΕΥΓΜΑ	5 εβδομάδες στους 2/8°C
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	μέχρι τη λήξη στους 2/8°C; 1 εβδομάδα στους 15/30°C στο σκοτάδι
ΔΙΑΛΥΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩ	μέχρι τη λήξη στους 2/8°C
ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ	έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες στους 2/8°C, 5 ημέρες στους 15/30 °C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΝΑ ΦΥΛΑΣΣΕΤΑΙ ΣΤΟΥΣ 2-8°C

Προσοχή:
Η παρούσα συσκευασία περιέχει ανθρώπινο υλικό που έχει περάσει από τεστ, εγκεκριμένα από την FDA, και έχει βρεθεί αρνητικό, τόσο όσον αφορά την HbsAg και όσον αφορά τα αντισώματα αντί-HIV-1, αντί-HIV-2 και αντί-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση και ασφάλεια ως προς την ύπαρξη ή μη μολυσματικών στοιχείων, κάθε ανθρώπινο υλικό πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τους κανονισμούς ασφαλείας που ισχύουν στο εργαστήριο. Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού, οι βαθμονομητές και οι ταινίες που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.
Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού και ο αντιδραστηρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Υποδείξεις για την προσωπική σας ασφάλεια

7. Μην κάνετε αναρρόφηση του δείγματος με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μιας χρήσης και προστατευτικά οφθαλμών κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Να πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά το τέλος κάθε ανάλυσης.
8. Τα παρακάτω αντιδραστήρια περιέχουν ερεθιστικές ή βλαβερές ουσίες σε χαμηλό βαθμό συγκέντρωσης:
    - Το διάλυμα έκλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
    - Το σύζευγμα και τα μείγματα ελέγχου περιέχουν φαινόλη
    - Το υπόστρωμα είναι όξινο

    Αν τυχόν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε πολύ καλά με άφθονο νερό
9. Τα εξαρτήματα που δεν είναι μιας χρήσης πρέπει να απολυμαίνονται μετά τη χρήση, κατά προτίμηση στον κλίβανο για 1 ώρα στους 121°C; τα δε εξαρτήματα μιας χρήσης πρέπει να ρίχνονται στα ειδικά απορρίμματα ή να αποτεφρώνονται.
10. Το θειικό οξύ του Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται στο πλύσιμο των υάλινων υλικών και εξαρτημάτων, είναι διαβρωτικά. Προσοχή στη χρήση τους. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα ή με τα μάτια πλύνετέ τα πολύ καλά με νερό.
11. Τα υγρά απόβλητα, αφού εξουδετερωθούν με αλκαλικές ουσίες, πρέπει να απολυμανθούν μέσω της προσθήκης υποχλωριώδους νατρίου, τόσο όσο χρειάζεται για να επιτευχθεί μια πυκνότητα τουλάχιστον του 1%. Η έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο στο 1% για 30 λεπτά θα πρέπει να είναι αρκετή για να εγγυηθεί μια αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν υγρά κατάλοιπα από δυνητικά μολυσματικά υλικά, πρέπει να καθαριστούν ταχύτατα με απορροφητικό χαρτί και η μολυσμένη επιφάνεια να καθαριστεί, π.χ. με υποχλωριώδες νάτριο στο 1%, πριν να συνεχίσετε τις αναλύσεις. Παρουσία οξέος το υποχλωριώδες νάτριο δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί πριν να στεγνώσει καλά όλη η επιφάνεια. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό επιφανειών από υγρά που προέρχονταν από τυχαίες εκχύσεις, μαζί και τα γάντια, πρέπει θεωρούνται ως δυνητικά μολυσματικά απορρίμματα. Μη βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Οδηγίες για μια σωστή ανάλυση

15. Πριν από τη χρήση αφήστε να φτάσουν τα αντιδραστήρια και τα δείγματα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C). Αμέσως μετά τη χρήση βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη θέση τους στη συνιστώμενη θερμοκρασία. **Είναι πολύ σημαντικό να έχετε μια σωστή ρύθμιση της θερμοκρασίας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ό,τι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.** Ανοίξτε τη συσκευασία με τις ταινίες αφού πρώτα την αφήσετε τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
16. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης. Αποφύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί μειώνεται η εγκυρότητα του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
17. Μην αλλάξετε τη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή από άλλη παρτίδα, παρά μόνον σε περίπτωση που αναγράφεται ό,τι το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώσετε τους συνιστώμενους χρόνους επώασης.
18. Όλα τα γυάλινα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται στα τεστ, πρέπει να πλένονται καλά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένονται καλά με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
19. Αποφύγετε τη χρήση καταψυκτών με αυτόματη απόψυξη, για τη διατήρηση των δειγμάτων.
20. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε δυνατό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς κατά την αποθήκευση ή την επώαση.
21. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτω.
22. Μην αφήνετε να στεγνώνουν τα βοθρία κατά τη διάρκεια των τεστ.
23. Αποφεύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε τις «ειδικές» πιπέτες.
24. Μην ακουμπάτε τα χείλη των βοθρίων με το σύζευγμα. Μην φυσάτε πάνω στις μικροπλάκες.
25. Οι ανοσοενζυματικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά ιδιάζοντα φαινόμενα στα χείλη ("edge effect"); Μπορείτε να τα ελαχιστοποιήσετε αυξάνοντας την υγρασία κατά την επώαση. Οι πλάκες πρέπει να καλύπτονται και μετά να τοποθετούνται για επώαση στους 37°C, ή σε μπενμαρί χρησιμοποιώντας ένα υποστήριγμα, ή στον επωαστήρα. Σαν εναλλακτική λύση οι πλάκες μπορεί να τοποθετηθούν για την επώαση σε έναν ειδικό αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες συμβουλευτείτε το βιβλίο οδηγιών της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε επωαστήρες που λειτουργούν με CO_2.
26. Πριν διαβάσετε την πλάκα βεβαιωθείτε ό,τι η βάση της είναι στεγνή και καθαρή και ό,τι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
27. Η χρησιμοποίηση δειγμάτων με υψηλή αιμόλυση, όχι τέλεια πηγμένου ορού, πλάσματος με ινίνη ή δειγμάτων με μικροβιακή μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
28. Διαβάστε το βιβλίο οδηγιών κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, δίνοντας μεγάλη προσοχή στα παρακάτω σημεία:
    - εγκατάσταση και ειδικές προϋποθέσεις.

- λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι.
- τεχνικές πληροφορίες του κατασκευαστή και αποδόσεις της συσκευής.
- συντήρηση και τεχνική εξυπηρέτηση

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

Το στάνταρντ είδος δείγματος αποτελείται από ορό προερχόμενο από κανονική αιμοληψία από μια φλέβα και πρέπει να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με τις καθορισμένες διαδικασίες ασφαλείας του εργαστηρίου. Ένα πρόσφατο δείγμα μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C και για μεγαλύτερες περιόδους στους –20°C . Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Τα δείγματα που έχουν αποψυχθεί, πρέπει να ανακινηθούν πολύ καλά πριν από την ανάλυση. Η αδρανοποίηση λόγω της θερμότητας μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Η ποιότητα του δείγματος μπορεί να αλλοιωθεί σε μεγάλο βαθμό από τυχόν μικροβιακή μόλυνση και να δώσει λανθασμένες ενδείξεις,
Δείγματα λιπαιμικά, ικτερικά, ή επιμεμολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.
Μη χρησιμοποιήσετε το παρόν τεστ σε πλάσμα ανθρωπίνου αίματος.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Προετοιμάστε τον απαραίτητο αριθμό ταινιών τεστ.
- Ετοιμάστε το διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:51 ρίχνοντας 20 µL ορού σε 1 mL διαλυτικού, και ρίξτε 100 µL αραιωμένου δείγματος σε κάθε βοθρίο (συνιστάται ανάλυση εις διπλούν). Τοποθετήστε σε μια ταινία τους ορούς ελέγχου ΟΧΙ ΑΡΑΙΩΜΕΝΟΥΣ (100 µL ανά βοθρίο). Είναι απαραίτητοι, τουλάχιστον, 1 αρνητικός, 2 cut-off και 1 θετικός.
Αφήστε ένα βοθρίο ελεύθερο για μια ανάλυση χωρίς δείγμα, χρησιμοποιώντας μόνο 100 µL από το υπόστρωμα.
Καλύψτε τα βοθρία με το προστατευτικό περίβλημα και τοποθετήστε τα για επώαση για 45 λεπτά σε 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διάρκειας 30 δευτερολέπτων η μία (300 µL) προσθέστε 100 µL συζεύγματος (ανασυνδυασμένες κεκαθαρμένες πρωτεΐνες της Ωχρής Σπειροχαίτης, προσημειωμένες με υπεροξιδάση)σε κάθε βοθρίο και βάλτε τα και πάλι στην επώαση για 45 λεπτά στους 37°C, αφού καλύψετε τα βοθρία με το προστατευτικό περίβλημα. Πλύντε και πάλι την πλάκα για 4 φορές, όπως περιγράφεται προηγούμενα, και βάλτε 100 µL υποστρώματος σε κάθε βοθρίο. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σταματήστε την ενζυματική αντίδραση με 100 µL Stop Solution. Διαβάστε την τιμή Απορρόφησης (O.D.) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.

9. Διάγραμμα της ανάλυσης

STEP 1 Βάλτε 100 µL ορού αραιωμένου/διαυγούς/ελέγχου στα βοθρία της ταινίας.
-
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
-
Ξεπλύνατε 4 φορές (300 µL)
-
STEP 2 Βάλτε 100 µL ενδεικτικού ανά βοθρίο.
-
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
-
Ξεπλύνατε 4 φορές (300 µL)
-
STEP 3 Βάλτε 100 µL υποστρώματος ανά βοθρίο.
-
Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
-
STEP 4 Προσθέστε 100 µL Stop Solution
-
Διαβάστε την τιμή Ισχύος της Απορρόφησης (O.D). στα 450 nm μέσα σε 30 min.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του διαυγούς από όλες τις άλλες (≤ 0.150). Οι τιμές της O.D. του ορού ελέγχου Cut-off πρέπει να φτάνουν το πολύ μέχρι το 25% της μέσης τιμής. Σε περίπτωση απόκλισης υπολογίστε και πάλι τη μέση τιμή. Το θετικό πρέπει να έχει μια τιμή OD ίση τουλάχιστον 1,5 φορά με την τιμή του Cut-off. Η σχέση μεταξύ του Αρνητικού και του Cut-off πρέπει να είναι ≤ 0,6. Η D.O. του cut-off πρέπει να ειναι ≥ 0,2 στα 450 nm και ≥ 0,16 στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αν η τιμή Ισχύος της Απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από το Cut-off, το δείγμα θα προκύψει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgM του αντιγόνου.
Υπολογίστε τη σχέση ,μεταξύ της μέσης τιμής της O.D. του εξεταζόμενου δείγματος και του Cut-off.
Το δείγμα θα είναι:

Θετικό: αν η σχέση είναι > 1.2.
Αμφίβολο: = ± 20% του Cut-off.
Αρνητικό: αν η σχέση είναι < 0.8.

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβατε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμείνει και πάλι αμφίβολο, τότε επαναλάβατε την αιμοληψία.

12. ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Τα αποτελέσματα του τεστ πρέπει να αντιπαραβληθούν με τα αποτελέσματα άλλων κλινικών και εργαστηριακών ερευνών.
Όπως στην περίπτωση των τιμών IgM άλλων μολυσματικών ασθενειών, ένα μικρό ποσοστό συφιλιδικών μπορεί να παρουσιάσει χαμηλά επίπεδα IgM αντί-Ωχρής Σπειροχαίτης, ακόμα και μετά την παρέλευση της φυσιολογικής περιόδου του 1-2 ετών.
Σε περιπτώσεις που υπάρχει υποψία πολύ πρόωρης σύφιλης, κατά τα οποία το τεστ μπορεί να δώσει αρνητικό αποτέλεσμα, αυτοί οι ασθενείς πρέπει να υποβληθούν σε ένα καινούργιο τεστ μετά από μία εβδομάδα περίπου.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Έγιναν τεστ σε δείγματα που περιείχαν δυνητικά στοιχεία παρεμβολής:
- Δείγματα υψηλά αιμολυμένου αίματος (n=3)
- Ρευματοειδής παράγων (μέχρι 1048 UI/ml) (n=5)
- Χολερυθρίνη (μέχρι 11 mg/dl) (n=5)
- Τριγλυκερίδια (μέχρι 1281 mg/dl) (n=4)

Σε καμιά περίπτωση το κιτ Enzywell Treponema IgM δεν επηρεάστηκε από το δείγμα.

Έχουν εξετασθεί 10 δείγματα, θετικά σε Brucella.
Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διασταυρούμενες αντιδράσεις.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Κατά τη διεξαγωγή ενός πειράματος αναλύθηκαν 148 δείγματα με το κιτ Diesse και με ένα άλλο κιτ του εμπορίου.
Παρακάτω έχουν σκιαγραφηθεί τα δεδομένα του πειράματος:

		Αναφορά		
		+	-	**Σύνολο**
Diesse	+	36	0	36
	-	0	112	112
	Σύνολο	36	112	148

Percent Positive Agreement (~Διαγνωστική ευαισθησία): 100% ($CI_{95\%:}$ 90.3-99.9)
Percent Negative Agreement: (~Διαγνωστική ειδικότητα): 100% ($CI_{95\%}$: 96.7-100)

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά την δοκιμή

	TPM1	TPM 2	TPM 3	Cut Off	Θετικός Έλεγχος
Αρ. Δοκιμών	24	24	24	12	12
Μέση D.O.	0.22	0.50	1.45	0.29	2.49
CV %	19	5	5	2	4

Ακρίβεια κατά τις δοκιμές

	INDEX	
Δείγμα	Μέση Τιμή	CV%
TPM3	4.1	11

TPM2	1.5	16
TPM1	0.7	16
Θετικός Έλεγχος	7.5	8

16. ΟΔΗΓΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ	ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΛΥΣΗ
Διαδικασία άκυρη (όλα αρνητικά)	Ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια δεν προστέθηκαν ή προστέθηκαν σε λάθος σειρά.	Ελέγξτε και πάλι τη διαδικασία. Ελέγξτε αν έχουν προστεθεί όλα τα αντιδραστήρια. Επαναλάβετε το τεστ.
	Η πλάκα δεν αντιδρά	Ελέγξτε τον κωδικό στην σακούλα της πλάκας (βλ. τις τεχνικές οδηγίες σχετικά με τον σωστό κωδικό).
		Ελέγξτε τυχόν παρουσία υγρασίας στην μη χρησιμοποιημένη πλάκα (Το ζελέ πυριτίου πρέπει να είναι ωχρό κίτρινο). Επαναλάβετε το τεστ.
Διαδικασία άκυρη (όλα θετικά)	Μολυσμένο υπόστρωμα	Χρησιμοποιήστε νέο,καθαρό υπόστρωμα.
	Ανεπαρκές πλύσιμο	Ελέγξτε αν η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Μειωμένη ακρίβεια	Ανεπαρκής αναρρόφηση από τα βοθρία	Ελέγξτε αν η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
	Ανεπαρκής αναρρόφηση από τα βοθρία	Ελέγξτε αν η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
	Λανθασμένη αναρρόφηση	Ελέξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Προσθήκη των αντιδραστηρίων πολύ αργή	Μην αφήσετε τα βοθρία να ξεραθούν μετά από την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια.
	Παρουσία φυσαλίδων αέρα	Αποφύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων αέρα κατά την αναρρόφηση.
	Οπτική διαδρομή όχι διαυγής	Ελέγξτε την φωτεινή πηγή για τυχόν παρουσία ακαθαρσιών. Καθαρίστε καλά την πλάκα με ένα χαρτομάντιλο.
Ανεπαρκής χρωματισμός	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τη ρύθμιση της θερμοκρασίας και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης
	Το υπόστρωμα προστέθηκε σε λάθος ποσότητα	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

7. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
8. S.A. Lukehart et al. Characterization of monoclonal antibodies to Treponema Pallidum. J. Immunology 134: 585 (1985).
9. S.A. Lukehart: Identification and characterization of Treponema Pallidum antigens by monoclonal antibodies. in: Monoclonal Antibodies, Academic Press 1986, p. 1.
10. L. Lewis et al.: Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 28: 296 (1990).
11. M. Norgard et al.: Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of Treponema Pallidum Nichols in the diagnosis of syphilis. J. Clin. Microbiol. 20: 711 (1984).
12. M.J. Bailey et al.: Production of murine monoclonal antibodies to the major axial filament polypeptide of Treponema pallidum. J. Gen. Microbiol. 133: 1805 (1987).

INSTRUCCIONES DE USO

ENZY-WELL
TREPONEMA IgM

REF 91051 **(Español)**

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO POR CAPTURA PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS DE CLASE IgM HACIA TREPONEMA PALLIDUM EN SUERO HUMANO.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La diagnosis en suero de la Sífilis es realizada demostrando la presencia de los niveles significativos de anticuerpos específicos para Treponema pallidum (TP) en el suero del paciente.
El método de referencia es el FTA-ABS, que permite la detección de IgG e IgM. Pero dado que la ejecución es laboriosa y la interpretación del test no es simple, se han introducido métodos alternativos para simplificar el procedimiento.
La técnica ELISA ofrece resultados automatizados, reproducibles y específicos, y por esta razón muchos operadores la prefieren.
La técnica específica de IgM, opuesta a la de IgG, es de particular importancia en la diagnosis de Sífilis congénita.

3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La prueba sobre la titulación Treponema pallidum IgM está fundada sobre el principio de la captura de estas imunoglobulinas y sucesiva revelación de las específicas, disfrutando de su capacidad de unir un antígeno conjugado a peroxidasa. La captura se efectúa con anticuerpos monoclonales unidos en la fase sólida (pocillos de microtitulación). El antígeno está constituido por proteínas recombinantes purificadas de Treponema Pallidum, marcadas con peroxidasa (1-6).

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de anticuerpos monoclonales IgM
Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (MM seguido por el número de lote); retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL
Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional
Color: el color de los calibradores es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1x2.5 mL
Contenido: Suero humano diluido de concentración conocida de anti-Treponema IgG, en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.
Color: el color de los calibradores es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL
Contenido: Proteinas recombinants purificadas de Treponema pallidum conjugado a peroxidasa, en tampón fosfato con fenolo 0,05% y Bronidox 0,02%.
Preparación: Listo para su uso sin dilución adicional.

CONTROL IgM - IgM CONTROL NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Solución salina tamponada, concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 10 DILUYENTE 10 (PF93621) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Solución de proteínas (10%) en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H_2O_2 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Solución de H_2SO_4 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).
BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS
- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linearidades por lo menos hasta OD ≥ 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volumenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10,100,1000 µl de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel adsorbente.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	**CONDICIONES**
MICROPLACA	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
SUEROS DE CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SOLUCIÓN DE PARADA	hasta la caducidad a 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

Cuidado:
Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos , cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, segun disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por via oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
    a) El tampón de lavado contiene detergentes
    b) El conjugado contiene fenol
    c) El substrato es ácido
    d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

    Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben disinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requier una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una disinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de se que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada . Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluídos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos . No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta**. **Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes.
8. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
9. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
10. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador**.** Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.
11. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
12. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación micróbiana.
13. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
14. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
    - instalación y requisitos específicos
    - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
    - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
    - mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a –20ºC. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser

almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede proveer resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.
No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.
El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Diluir las muestras 1:51 poniendo 20 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla substrato.
Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado (proteinas recombinantes de Treponema pallidum conjugadas a peroxidasa) a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.
Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.
Leer la Absorbancia (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/blanco/controles en los pocillos.
-
Incubar 45 min. a 37°C
-
Lavar 4 veces (300 µL)
-
STEP 2 Añadir 100 µL de trazador a cada pocillo
-
Incubar 45 min. a 37°C
-
Lavar 4 veces (300 µL)
-
STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo
-
Incubar 15 min. a T.A.
-
STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante
-
Leer la adsorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (<= 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben estar dentro del 25% del valor medio. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces del suero Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6. La D.O. del cut-off debe ser ≥ 0,2 a 450 nm e ≥ 0,16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas para el antígeno.
Calcular la relación entre el valor medio de D.O. de la muestra y la del Cut-off .
La muestra se considera:

Positiva: si la relación es > 1.2.
Dudosa: ± 20% del Cut-off.
Negativa: si la relación es < 0.8.

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

12. LIMITACIONES

El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de otros procedimientos de diagnóstico. Como en la respuesta de IgM en otras enfermedades infecciosas, un pequeño número de pacientes sifilíticos puede presentar niveles persistentemente bajos de IgM hacia T. pallidum también después del normal período de 1-2 años.
En caso de sospecha de Sífilis precoz, en la cual el test resulta negativo, estos pacientes tendrían que ser analizados nuevamente pasada una semana.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Las muestras siguientes fueron ensayadas conteniendo substancias potencialmente interferentes:
- Muestras fuertemente hemolizadas (n = 3)
- Factor Reumatoideo (hasta 1048 IU/ml) (n = 5)
- Bilirubina (hasta 11 mg/dl) (n = 5)
- Trigliceridos (hasta 1281 mg/dl) (n = 4).

En ningún caso el resultado del Enzywell Treponema IgM fue afectado por ese tipo de muestra.

10 muestras, positivas en Borrelia fueron testadas.
No se detectaron reacciones cruzadas significativas.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba, se analizaron 148 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.
A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	**-**	**Total**
Diesse	**+**	36	0	36
	-	0	112	112
	Total	36	112	148

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico): 100% ($CI_{95\%:}$ 90.3-99.9)
Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico): 100% ($CI_{95\%}$: 96.7-100)

15. PRECISIÓN

Precisión dentro de la misma serie

	TPM1	TPM2	TPM3	Cut off	Control Positivo
N =	24	24	24	12	12
O.D.	0.22	0.50	1.45	0.29	2.49
CV%	19	5	5	2	4

Precisión entre series

	INDEX	
Muestra	Media	CV%
TPM3	4.1	11
TPM2	1.5	16
TPM1	0.7	16
Control Positivo	7.5	8

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	**POSSIBLES FUENTES DE ERROR**	**PRUEBA U ACCIONES**
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea.	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).

		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S.A. Lukehart et al. Characterization of monoclonal antibodies to Treponema Pallidum. J. Immunology 134: 585 (1985).
3. S.A. Lukehart: Identification and characterization of Treponema Pallidum antigens by monoclonal antibodies. in: Monoclonal Antibodies, Academic Press 1986, p. 1.
4. L. Lewis et al.: Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 28: 296 (1990).
5. M. Norgard et al.: Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of Treponema Pallidum Nichols in the diagnosis of syphilis. J. Clin. Microbiol. 20: 711 (1984).
6. M.J. Bailey et al.: Production of murine monoclonal antibodies to the major axial filament polypeptide of Treponema pallidum. J. Gen. Microbiol. 133: 1805 (1987).

INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

ENZY-WELL
TREPONEMA IgM

REF 91051 **(Français)**

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE A CAPTURE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM DANS LE SERUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

Le diagnostic sérologique de la syphilis s'effectue au travers de l'identification des anticorps spécifiques pour le Tréponème pallidum à titre significatif dans le sérum du patient. La FTA-ABS est la méthode de référence qui permet de détecter les IgG ainsi que les IgM. Etant donné que l'exécution de cette méthode est laborieuse et que l'interprétation des résultats n'est pas facile, des méthodes alternatives ont été recherchées pour en simplifier le déroulement. La technique ELISA garantit l'obtention automatique de résultats répétables et spécifiques. La recherche et le dosage spécifique des IgM par opposition aux IgG est d'une importance tout particulière pour le diagnostic de la syphilis congénitale.

3. PRINCIPE

Le test pour le dosage des IgM anti-*Treponema pallidum* est basé sur le principe de la capture de ces immunoglobulines et de leur détermination, en exploitant leur capacité de lier un antigène conjugué à la peroxydase. La capture se réalise en utilisant des anticorps monoclonaux liés à la phase solide (puits sur la plaque). L'antigène se constitue de protéines recombinantes purifiées du *Treponema pallidum*, marquée à la peroxydase.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 96 réactions.

Porter les réactifs à la température ambiante avant l'utilisation.

MT PLATE MICROPLAQUE 12x8 puits sensibilisés avec des anticorps monoclonaux anti-IgM humaines
Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (MM, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1x1.6 mL
Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-Tréponème, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1x2.5 mL
Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-Tréponème, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

CONJ CONJUGUE 1x16 mL
Composition : Protéines recombinants purifiées de *Treponema pallidum* marquées à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox.
Préparation : Prêt à l'emploi.

CONTROL IgM - CONTROLE NEGATIF IgM (PF93900) 1x1.6 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0,01 mol/l avec 1 % de BSA et 0,09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1x100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5 % de brij.

Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.
En présence de cristaux : chauffer la solution **à 37 °C** pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 10 DILUANT 10 (PF93611) 1x100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Pour diluer les échantillons de sérum.
Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09 % et de méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Prêt à l'emploi **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/ml) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H_2SO_4 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**
Composition : H_2SO_4 (à 0.3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)
FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI
- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à ≥ 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Chronomètre
- Solution 5 % de sodium hypochlorite
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. MODALITE DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à 2-8 °C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette apposée sur l'étiquette.

Les réactifs ont une stabilité limitée après l'aperture et/ou la préparation.

REACTIF	**CONDITIONS**
MICROPLAQUE	5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.
CONTROLES	5 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	5 semaines à 2/8 °C
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8 °C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C.
SOLUTION D'ARRET	jusqu'à péremption à 2/8 °C.

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION

POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.

ATTENTION : **Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Bien que tous les produits d'origine humaine aient subi un contrôle de dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag HBs en utilisant des méthodes approuvées par la FDA, ils doivent être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux. Elimination des résidus : les échantillons de sérum, les étalons et les barrettes usés doivent être traités comme des déchets infectieux. Ils doivent donc être éliminés conformément aux dispositions législatives en vigueur.**

Elimination des résidus: les échantillos de serum et les reactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS POUR LA SECURITE PERSONNELLE
1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des lunettes de protection quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :

a) Le tampon de lavage contient des détergents.
b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol.
c) Le substrat est acide.
d) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09 %). Les azides peuvent réagir avec les métaux des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.
En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.

3. Les instruments que ne sont pas à jeter doivent être stérilisés après l'emploi, de préférence en autoclave pendant 1 h à 121 °C. Les matériaux à jeter doivent être mis en autoclave ou incinérés.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les matériaux liquides à jeter doivent être neutralisés avec une solution alcaline, puis décontaminés avec une solution d'hypochlorite de sodium (en volume suffisant pour obtenir une concentration finale d'au moins 1 %). Une exposition au sodium hypochlorite 1 % pendant 30 minutes suffit pour garantir une décontamination efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer la zone, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1 %), avant de continuer le test. En présence d'un acide, on pourra utiliser l'hypochlorite de sodium seulement après avoir essuyé la zone. Tous les matériaux utilisés pour éliminer les effets d'un renversement accidentel doivent être jetés comme étant potentiellement infectieux.

AVERTISSEMENTS ANALYTIQUES

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. **Le thermostat ne doit descendre ni au-dessous de 35 °C, ni au-dessus de 39 °C.** Ouvrir le sachet contenant les barrettes après 30 minutes de maintien à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter les contaminations microbiennes des réactifs qui peuvent réduire les perfomances des réactifs et entraîner des résultats érronés.
3. Ne pas changer de procédure, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est **interchangeable entre lots** . Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorite pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter que les puits sèchent pendant la durée du test.
7. Ne pas conserver les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique.
8. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
9. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
10. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou au bain-marie. Autrement, il est possible de faire incuber les plaques dans une analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO_2.
11. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
12. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé, ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
13. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
14. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
    - à l'installation et aux avertissements spécifiques
    - au principe opérationnel, aux instructions, précautions, risques
    - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
    - à la maintenance et à l'assistance technique.

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon peut se constituer de sérum prélevé normalement en observant toutes les précautions prévues dans le laboratoire.
Les sérums frais peuvent être utilisés encore au bout de 4 jours de conservation entre +2°/+8°. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de troi décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation.

Les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Si la contamination est perceptible à l'œil nu, l'échantillon doit être éliminé. En outre, il n'est pas possible d'utiliser les échantillons fortement lipémiques, ictériques, hémolysés ou contaminés.
Les plasmas humains ne peuvent pas être utilisés.

8. PROCEDURE

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :
  Diluer la solution **de lavage concentrée** (par exemple : 100 ml + 900 ml d'eau distillée).

Diluer les échantillons à 1 :51 en versant 20µl de sérum dans 1 mL de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Mettre les contrôles NON dilués (100 µl/puits) dans une barrette. Il est indispensable de déposer au moins 1 contrôle négatif et 1 contrôle positif et 2 cut-off. Utiliser le puits A1 pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits.
Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µL), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter 100 µl de conjugué (protéines recombinantes purifiées du Treponema pallidum marquées à la peroxydase) dans chaque puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt.
Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes.

9. SCHEMA D'ANALYSE

Table 1 :	Verser 100 µL de sérum dilué/contrôle dans les puits correspondants
	Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µL)
Table 2 :	Verser 100 µL du conjugué dans les puits
	Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.
	Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µL)
Table 3 :	Déposer 100 µl de substrat dans les puits
	Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.
Table 4 :	Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits
	Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

10. VALIDATION DU TEST

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (≤ 0.150).
Calculer les valeurs du contrôle seuil. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus ± 25 % de la valeur moyenne, sinon éliminer la valeur aberrante. Recalculer la moyenne. Le contrôle positif doit avoir une D.O 1,5 fois supérieure à celle du sérum seuil. Le rapport des D.O du contrôle négatif et du sérum seuil doit être ≤ 0,6. La D.O. du contrôle seuil doit être ≥ 0.2 à 450 nm et ≥ 0.16 à 450/620 nm.

11. INTERPRETATION DU TEST

Si la valeur du D.O. du sérum est supérieure au sérum seuil, l'échantillon est positif à la présence des IgM spécifiques contre le tréponème.
Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Indice).
L'échantillon est considéré comme étant :

Positif :	si le rapport est > 1.2
Incertain:	si le rapport est compris 0.8 et 1.2
Négatif :	si le rapport est > 0.8

Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat est de nouveau incertain, réaliser de nouveaux prélèvements d'échantillons de sang.

12. LIMITES DU TEST

Les résultats obtenus doivent être utilisés en tenant compte des informations disponibles provenant de l'évaluation clinique et d'autres procédures diagnostiques.
Comme dans le cas d'autres maladies infectieuses, la réponse en IgM peut rester positive, mais à titre faible chez certains patients, même après le période maximale normale de 1-2 ans. Si l'on suspecte une infection très précoce de syphilis et que le résultat est négatif, il est conseillé d'effectuer un contrôle au bout d'une semaine.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

Nous avons testé des échantillons contenant des substances potentiellement interférentes:
- Fortement hémolysés (n = 3)
- Facteur Rhumatoïde (jusqu'à 1048 UI/ml) (n = 5)
- Bilirubine (jusqu'à 11 mg/dl) (n = 5)
- Triglycérides (jusqu'à 1281 mg/dl) (n = 4).

Aucune interférence n'a été observée.

10 échantillons positifs aux Borrelia ont été testés.
Aucune réaction croisée significative n'a été relevée.

14. SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

Au cours d'un essai, 148 échantillons ont été analysés avec le kit Diesse et avec un autre kit en vente dans le commerce.
Les données de l'essai sont schématisées ci-après :

		Référence		
		+	**-**	**Total**
Diesse	**+**	36	0	36
	-	0	112	112
	Total	36	112	148

Percent Positive Agreement (~Sensibilité diagnostique) : 100% ($CI_{95\%}$: 90.3-99.9)
Percent Negative Agreement: (~Spécificité diagnostique) : 100% ($CI_{95\%}$: 96.7-100)

15. PRECISION

Précision intra-série

	TPM1	TPM2	TPM3	Seuil	Contrôle Positif
N =	24	24	24	12	12
D.O.	0.22	0.50	1.45	0.29	2.49
CV %	19	5	5	2	4

Précision inter-séries

Echantillon	Moyenne	CV %
TPM3	4.1	11
TPM2	1.5	16
TPM1	0.7	16
Contrôle Positif	7.5	8

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	**CAUSES POSSIBLES**	**ACTION/CONTROLE**
Test non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en	Contrôler la procédure. Contrôler s'il y a une solution inutilisée.

	ordre erroné.	Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire les instructions, par. 4).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Test non valable (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever un nouvelle quantité de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que le laveur fonctionne correctement.
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement.
	Erreur de pipetage	S'assurer que le laveur fonctionne correctement.
	Ajout des réactifs trop long	Eviter le dessèchement des puits de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Eviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.
	Parcours optique sale	Contrôler la source lumineuse (présence d'impuretés). Essuyer le fond des puits avec du papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Volume de substrat versé dans les puits incorrect.	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

7. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
8. S.A. Lukehart et él. Characterization of monoclonal antibodies to Treponema Pallidum. J. Immunology 134: 585 (1985).
9. S.A. Lukehart: Identification and characterization of Treponema Pallidum antigens by monoclonal antibodies. in: Monoclonal Antibodies, Academic Press 1986, p. 1.
10. L. Lewis et él.: Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 28: 296 (1990).
11. M. Norgard et él.: Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of Treponema Pallidum Nichols in the diagnosis of syphilis. J. Clin. Microbiol. 20: 711 (1984).
12. M.J. Bailey et él.: Production of murine monoclonal antibodies to the major axial filament polypeptide of Treponema pallidum. J. Gen. Microbiol. 133: 1805 (1987).

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZY-WELL
TREPONEMA IgM

REF **91051** **(Português)**

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO DE CAPTURA IMUNO-ENZIMÁTICA PARA A DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ANTICORPOS DE CLASSE IGM AO TREPONEMA PALLIDUM NO SORO HUMANO.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O diagnóstico serológico da sífilis é efectuado demonstrando a presença de níveis significativos de anticorpos do Treponema pallidum na amostra de soro.
O método de referência utilizado é a técnica FTA-ABS, que permite a detecção de IgG e IgM. Contudo, a sua execução é laboriosa e a interpretação dos resultados não é simples; métodos alternativos foram por isso introduzidos para simplificar o procedimento. O ELISA fornece resultados específicos totalmente automatizados e reproduzíveis, pelo que é preferido por muitos operadores.
Ao contrário do ensaio IgG, o ensaio específico da IgM assume uma particular importância no diagnóstico da Sífilis congénita.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste baseia-se na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática) (1-6) baseado no prinipio da captura destas Imunoglobulinas e a subsequente identificação das che são especifícas, fazendo uso da sua habilidade para ligar um antígeno conjugado à peroxidase. A captura é realizada usando anticorpos monoclonais ligados à fase sólida (poços de microtitualação). O antígeno é composto por proteínas recombinantes purificadas de Treponema Pallidum, marcado com peroxidase (1-6).

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.
- **Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

MT PLATE MICROPLACA 12 x 8 poços cobertos com anticorpos monoclonais IgM anti-humanos.

Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (MM seguido do número do lote), que é útil para fins de identificação, retire o suporte e as tiras da embalagem folheada para serem usadas e coloque as tiras não usadas no saco de polietileno com sílica gel, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1x1.6 mL
Conteúdo: Soro humano diluído, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1x2.5 mL
Conteúdo: Soro humano diluído, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL
Conteúdo: proteinas recominantes purificadas de Treponema pallidum conjugadas com peroxidase, numa tampão fosfatado contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CONTROL IgM - IgM CONTROLO NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L, com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

WASH BUF 10X TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1x100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0,5%.
Preparação: dilua o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37ºC antes da diluição.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1x100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Para diluição de amostras de soro
Conteúdo: Solução proteíca em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante .
Preparação: Pronto a usar.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0,01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3.8). Pronto a usar.

H_2SO_4 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
H_2SO_4 a 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.
A ficha de segurança MSDS está disponível para ser fornecida ao pessoal laboratorial que assim o solicitar.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).
SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS
- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas, comprimento de onda 450 ou 450/620 nm e 405 nm, com uma linearidade da DO até 2000 (no mínimo).
- Sistema de lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µl
- Água destilada ou desionizada.
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste etc.
- Micropipetas e pontas (10, 100, 1000 µl) com uma precisão de ± 2%
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.
O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo da embalagem

Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	8 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Soros de controlo	5 semanas a 2/8°C
Conjugado	5 semanas a 2/8°C
Substrato	até ao prazo de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
Diluente de amostras	até à data de validade a 2/8°C
Tampão de lavagem	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C
Solução de paragem	até ao prazo de validade a 2/8ºC

6. PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

Cuidado:
Este kit contém materiais de origem humana que foram examinados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.

Informação de saúde e segurança

1.Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave as mãos meticulosamente quando tiver acabado.

2.Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.

a) O tampão para enxaguar contém detergentes

b) O conjugado e os controlos contêm fenol

c) O substracto é ácido

d) Os controlos contêm azida de sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.

3.Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.

4.O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e ácido hidroclórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.

5.Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1.0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.

6.Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1.0%, por exemplo, antes de o trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado com salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

Precauções analíticas

1.Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Verifique se o termostato não desce abaixo de 35ºC ou acima de 39ºC.**

2.Não utilize reagentes além da data de validade anunciada. Contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.

3.Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam estipulados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.

4.Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidroclórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.

5.Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.

6.Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.

7.Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras.

8.Deve-se ter cuidado para não haver contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.

9.Deve ser tomado cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “assopre” as microplacas.

10.Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO_2 não devem ser utilizados.11.Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhumas bolhas estão presentes na superfície do líquido antes de a ler.

11.A utilização de amostras altamente hemolisadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.

12.O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.

13.Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:

- instalação e requisitos particulares
- princípios de operação, instruções, precauções e riscos
- especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
- manutenção e reparação

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta de soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções por boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a –20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente batidas antes de efectuar o teste. A inactivação por calor não leva a dados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.
Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictéricas devem ser evitadas.
O teste não pode ser executado em amostras de plasma.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Prepare a quantidade necessária de tiras.
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H_2O).

Dilua as amostras na proporção de 1:51 distribuindo 20 µL de soro em 1mL de diluente. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados). Coloque numa tira o controlo positivo, o controlo negativo e o controlo directo (cut-off) NÃO DILUÍDOS (100 µL em cada poço). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo. Deixe um poço para o branco, que será realizado distribuindo apenas 100 µL da mistura de substrato.
Cubra os poços com película protectora e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (em 300 µL, com 30 segundos de tempo de enxaguamento), junte 100 µL de conjugado (proteinas recominantes purificadas de Treponema pallidum conjugadas com peroxidase) a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com película protectora. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído (100 µL/poço). Após 15 minutos à temperatura ambiente, pare a reacção enzimática com 100 µL de solução de paragem. Leia a D.O. a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

STEP 1	Coloque 100 µL de amostra diluída/controlos não diluídos nos poços das tiras.
	-
	Incube durante 45 min. a 37°C
	-
	Lave 4 veces (300 µL)
	-
STEP 2	Adicione 100 µL de conjugado em cada poço
	-
	Incube 45 min. a 37°C
	-
	Lave 4 veces (300 µL)
	-
STEP 3	Adicione 100 µL de Substrato a a cada poço
	-
	Incube durante 15 min. à temperatura ambiente
	-
STEP 4	Adicione 100 µL de solução de paragem
	-
	Leia a absorvência a 450/620 nm dentro de 30 min.

10. VALIDAÇÃA DO TESTE

A D.O. do branco deve ser de ≤ 0.150. Subtraia o valor do branco de todas as outras leituras. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vezes a do soro directo. A relação entre Controlo Negativo e Controlo Directo deve ser ≤ 0.6.
A D.O. do Directo deve ser ≥0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se a adsorção da amostra for superior ao valor directo, a amostra é positiva para a presença de IgM específico.
Calcule a relação entre o valor DO médio da amostra e o do directo.
A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2.
Duvidosa: se a relação estiver entre 0.8 e 1.2 (± 20% do Directo)
Negativa: se a relação for < 0.8.

Se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os risultados deste teste devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriasi. Tal como na resposta IgM em outras doenças infecciosas, um número reduzido de doentes de sífilis podem apresentar níveis baixos constantes de IgM para o Treponema pallidum, mesmo após o período máximo normal de 1-2 anos.
Nos casos de suspeita de sífilis em que o teste dá um resultado negativo por ter sido efectuado num estádio muito precoce da doença, os doentes devem efectuar novo teste uma semana depois.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas as seguintes amostras contendo substâncias potencialmente interferentes:
- Amostras altamente hemolizadas (n=3)
- Factor Reumatóide (até 1048 Ul/ml) (n=5)
- Bilirubina (até 11 mg/dl) (n=5)
- Triglicéridos (até 1281 mg/dl) (n=4)

Não houve nenhum caso em que o resultado do teste Treponema IgM tivesse sido influenciado pelo tipo de amostra.

10 amostras, positivas em Borrelia foram testadas.
Não foram detectadas reações cruzadas significativas.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Numa experimentação foram analisadas 148 amostras com o kit Diesse e com um outro kit do mercado.
Esquematizam-se, de seguida, os dados da experimentação:

		Referência		
		+	**-**	**Total**
Diesse	**+**	36	0	36
	-	0	112	112
	Total	36	112	148

Percent Positive Agreement (~Sensibilidade Diagnóstica): 100% ($CI_{95\%}$: 90.3-99.9)
Percent Negative Agreement: (~Especificidade Diagnóstica): 100% ($CI_{95\%}$: 96.7-100)

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaio

Amostra	TPM1 (Negativo < Directo)	TPM 2 (Positivo >Directo	TPM 3 (Fortemente positivo)	Directo	Controlo Positivo
N. Réplicas	24	24	24	12	12
Médias O.D.	0.22	0.50	1.45	0.29	2.49
CV %	19	5	5	2	4

Precisão entre ensaios

	INDICE	
Amostra	Médias	CV%
TPM3	4.1	11
TPM 2	1.5	16
TPM 1	0.7	16
Controlo	7.5	8

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no anexo da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dissecante de gel de sílica deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substracto.
	Lavagem inadequada	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções recomendadas de utilização.
	Volume inadequado do substracto adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S.A. Lukehart et al. Characterization of monoclonal antibodies to Treponema Pallidum. J. Immunology 134: 585 (1985).
3. S.A. Lukehart: Identification and characterization of Treponema Pallidum antigens by monoclonal antibodies. in: Monoclonal Antibodies, Academic Press 1986, p. 1.
4. L. Lewis et al.: Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. J. Clin. Microbiol. 28: 296 (1990).
5. M. Norgard et al.: Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of Treponema Pallidum Nichols in the diagnosis of syphilis. J. Clin. Microbiol. 20: 711 (1984).
6. M.J. Bailey et al.: Production of murine monoclonal antibodies to the major axial filament polypeptide of Treponema pallidum. J. Gen. Microbiol. 133: 1805 (1987).

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution,consult accompanying documents Atención,ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbricante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n"tests Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις Conteúdo suficiente para “n” ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
REF	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
IVD	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
LOT	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

CE

DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy