

## NovaLisa™

# Treponema pallidum IgG – ELISA (recombinant)



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of antibodies against *Treponema pallidum* in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Humanserum oder Plasma

Enzyme immunoassay pour la détermination qualitative des anticorps IgG contre *Treponema pallidum* en sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgG per *Treponema pallidum* nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de los anticuerpos IgG contra *Treponema pallidum* en suero o plasma humano

### Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 11
Français:	Page	12 à 16
Italiano:	da Pagina	17 a 21
Espanol:	Página	22 a 26

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	30
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	31
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	32

---

Product Number: TREG0470 (96 Determinations)

---

## 1. INTRODUCTION

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

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

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of Infection
Treponema pallidum	Syphilis	Skin eruption of various appearances with mucous patches Formation of gumma, cardiovascular lesions Lesions in central nervous system	Transmission by direct contact: - acquired syphilis: sexual transmission - congenital syphilis: transmission through the placenta where the fetus is transfected

Infection may be identified by:

- Microscopy: darkfield examination in primary stages by demonstrating motile treponemes in a channel
- Serology: Detection of antibodies utilizing lipoidal antigens (RPR, VDRL) or TPHA, Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test (FTA-ABS)

## 2. INTENDED USE

The NovaTec Treponema pallidum IgG ELISA (recombinant) is intended for the qualitative determination of antibodies against Treponema pallidum antigens in human serum or plasma (citrate). This assay offers increased diagnostic specificity and sensitivity by employing purified recombinant antigens. The assay can be used for diagnosis of Treponema pallidum infections in health care institutions and for screening in blood banks.

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of antibodies against Treponema pallidum is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are pre-coated with Treponema pallidum recombinant antigens r15, r17, r44 to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled Protein A conjugate is added. This conjugate binds to the captured Treponema pallidum-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Treponema pallidum specific antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

- **Treponema pallidum Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with recombinant Treponema pallidum antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent\*\*\*:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Treponema pallidum Protein A Conjugate\*\*:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase Protein A; coloured blue, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Treponema pallidum Positive Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Treponema pallidum Cut-off Control\*\*\*:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Treponema pallidum Negative Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

\* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

\*\* contains 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contains 0.1 % Kathon

## 4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

## 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

## 6. REAGENT PREPARATION

---

*It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!*

### 6.1. Coated Snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with recombinant *Treponema pallidum* antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

### 6.2. *Treponema pallidum* Protein A Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with Protein A, horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. Protein A is an immunoglobulin Fc-binding protein with a molecular weight of 42,000 Dalton. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

### 6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

### 6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer will keep for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

### 6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be discharged. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

### 6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date.*

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*  
Heat inactivation of samples is not recommended.

## 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

*It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.*

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour  $\pm$  5 min at  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be  $>5$  sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
*Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.*
5. Dispense 100µl Treponema pallidum Protein A Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*  
*Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.*
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

### 8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

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

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

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

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

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

### 9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43

$$\text{Cut-off} = 0.43$$

### 9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

#### 9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example:  $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

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

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 10.1. Precision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	4	2.444	5.1
<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>Cv (%)</b>
Pos. Serum	8	2.621	1.5%

### 10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is >98 %.

### 10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is >98 %.

### 10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

<b>Note:</b> The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.
--

## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value. It is recommendable testing positive results with an alternative test system.

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
----------	---

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
----------	--

### 12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.: TREG0470 Treponema pallidum IgG-ELISA (recombinant) (96 Determinations)

## 1. EINLEITUNG

Treponemen sind dünne (0,2 µm), 5 bis 20 µm lange Schraubenbakterien mit zehn bis 20 Windungen. Sie können sich in flüssigen Medien rotierend und gelegentlich undulierend fortbewegen. Alle pathogenen Spezies gehören zur Familie der Treponemataceae, zu der Treponemen, Borrelien und Leptospiren gehören. Treponema pallidum ist der Erreger der Syphilis. Die Übertragung erfolgt immer direkt durch Kontakt mit dem Erkrankten, in der Regel beim Geschlechtsverkehr. Eintrittspforte für die Ansteckung sind kleinste Läsionen der scheinbar gesunden Haut und Schleimhaut. Eine Sonderform stellt die diaplazentare Übertragung der Erreger dar (Lues connata). Sofern es nicht zum Absterben der Frucht kommt, erfolgt die Geburt eines - sowohl körperlich als auch geistig - schwer geschädigten Kindes. Der klinische Verlauf der Lues lässt sich in drei Stadien einteilen:

Lues I (Primärstadium): nach einer Inkubationszeit von ca. drei Wochen entwickelt sich an der Inokulationsstelle der Primäraffekt. Man versteht darunter eine schmerzlose Induration, die später geschwürartig zerfällt (harter Schanker). Aus ihm entsteht durch Streuung der Erreger auf dem Lymphweg der Primärkomplex, d. h. es kommt zum Anschwellen der regionalen Lymphknoten. Stadium ist hoch contagios und verschwindet auch ohne Therapie nach ca. vier Wochen, um in die

Lues II (Sekundärstadium) einzumünden. Klinisch dominieren Exanthem und Enanthem. Die Infektion ist generalisiert. Die Hauterscheinungen klingen nach zwei bis drei Wochen auch ohne Therapie ab. Die Lues II kann immer wieder rezidivieren oder als Lues latens klinisch stumm bleiben. Sie kann schließlich nach Monaten oder Jahren in die

Lues III (Tertiärstadium) übergehen. Dieses Stadium ist nicht mehr infektiös. Gefährlich ist die Ausbildung von Gummen (Granulome gummiartiger Konsistenz) und die dadurch eintretende Gewebedestruktion. Mesoarthritis luetica, luetische Meningitis, progressive Paralyse und Tabes dorsalis sind klinische Erscheinungsformen des Tertiärstadiums.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Infektionsmodus
Treponema pallidum	Syphilis	Ulcus durum, Exanthem, chronisch-entzündliche Gefäßprozesse an ZNS und Aorta (Tabes dorsalis, Aortenaneurysma)	Übertragung durch direkten Kontakt  erworben: sexuelle Übertragung  kongenital: Übertragung auf den Fetus über die Plazenta

Infektionen können nachgewiesen werden durch:

- Dunkelfeldmikroskopie
- Serologie: Nachweis spezifischer Antikörper mittels TPHA-Test, FTA-Abs-Test, TPI-Test, VDRL, ELISA

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Treponema pallidum IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Treponema pallidum in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen das Treponema pallidum beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Treponema pallidum spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertes Protein A bindet an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstanden Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

## 4. MATERIALIEN

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Treponema pallidum beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Treponema pallidum-Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdüpfungspuffer\*\*\*:** 1 Flasche mit 100ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15ml Schwefelsäure, 0.2mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):\*** 1 Flasche mit 50ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Treponema pallidum Protein A-Konjugat\*\*:** 1 Flasche mit 20ml Peroxidase-konjugiertem Protein A; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Treponema pallidum IgG-Positivkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

- **Treponema pallidum IgG Cut-off Kontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
  - **Treponema pallidum IgG-Negativkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- \* enthält 0.1% Bronidox L nach Verdünnung  
 \*\* enthält 0.2% Bronidox L  
 \*\*\* enthält 0.1% Kathon

#### 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

#### 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

### 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Aussenetikett angegeben.

### 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

*Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen !*

#### 6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem *Treponema pallidum* Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

#### 6.2. *Treponema pallidum* Protein A-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von Protein A, Meerrettich-Peroxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

#### 6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1% Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

#### 6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

#### 6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Der Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, den Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

#### 6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht bläulich. Sollte die TMB-Substratlösung nach blau umschlagen, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.*

#### 6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tief gefrieren (-20°C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*  
Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

### 7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

*Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.*

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschliessend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

*Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl Treponema pallidum Protein A-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäss Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*

*Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgG-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

## 8.2. Messung

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

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

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

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

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

---

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

### 9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

*Beispiel:*  $0.57 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.59 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 1.16 : 2 = \underline{0.58}$

$$\text{Cut-off} = \underline{0.58}$$

### 9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10% höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10% über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10% unterhalb des Cut-Offs liegt.

#### 9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

*Beispiel:*  $\frac{1.856 \times 10}{0.58} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

## 10. TESTMERKMALE

---

### 10.1. Präzision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Vk (%)</b>
Pos. Serum	4	2.444	5.1
<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Vk (%)</b>
Pos. Serum	8	2.621	1.5

### 10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >98 %.

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >98 %.

## 10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschliessen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

**WARNUNG:** Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

**WARNUNG:** Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

### 12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

## 13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: TREG0470 Treponema pallidum IgG-ELISA (rekombinant) (96 Bestimmungen)

## 1. INTRODUCTION

Les spirochètes sont des bactéries motiles avec un filament axial périplasmique. Toutes les espèces pathogènes appartiennent à la famille Treponemataceae, qui inclut les trois genres : Treponema, Borrelia, et Leptospira. Les Treponema sont des bactéries motiles, de 5-15µ en longueur et de 0.2µ en largeur, qui contiennent environ 10 bâtonnets flexibles et ondulés en forme de spirale. Treponema pallidum, l'agent causatif de syphilis, est transmise par le contact direct, généralement par des rapports sexuels. La syphilis, ainsi que la gonorrhée, le Chancroid, et Lymphogranuloma venereum, est désigné comme maladie vénérienne. Elle est une maladie infectieuse aiguë et chronique. Après une période d'incubation de 12-30 jours, les premiers symptômes qui apparaissent sont des chancres, bientôt suivis d'ulcères syphilitiques qui disparaissent en quelques semaines. Pendant cette première phase (syphilis primaire) Treponema pallidum se propage dans les ganglions lymphatiques et par cette voie atteint la circulation du sang. Les phases de maladie qui suivent sont désignées comme syphilis secondaire, tertiaire, et quaternaire.

Le traitement avec des antibiotiques dans la première phase de la maladie, ainsi que des mesures prophylactiques sont des précautions pour prévenir des épidémies. À cette fin, des contrôles prénataux et des contrôles de don de sang sont obligatoires dans la plupart des pays autour du monde.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
Treponema pallidum	Syphilis	De diverses éruptions avec des taches muqueuses tissus fibreux, lésions cardiovasculaires lésions dans le système nerveux central	Transmission par contact direct : - Syphilis acquise : transmission sexuelle - Syphilis congénitale : transmission par le placenta où le fœtus est transfecté

L'infection peut être identifiée par :

- Microscopie : examen de champ sombre dans les phases primaires peut détecter les tréponèmes motiles
- Sérologie : Détection des anticorps, en utilisant des antigènes lipidiques (RPR, VDRL) ou le TPHA, test d'absorption des anticorps fluorescents contre Treponema (FTA-ABS)

## 2. UTILISATION PRÉVUE

L'ELISA d'IgG de Treponema pallidum de NovaTec est prévu pour la détermination qualitative des anticorps contre Treponema pallidum en sérum humain ou plasma (citrate).

## 3. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps contre Treponema pallidum est basée sur la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Des puits dans les bandes du plaque microtitre sont recouverts d'antigènes de Treponema pallidum pour attacher les anticorps correspondants du spécimen. Après le lavage des puits ayant pour but d'enlever l'échantillon détaché, la protéine A conjuguée à HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Ce conjugué s'attache aux anticorps spécifiques pour le Treponema pallidum. Le complexe immun constitué par le conjugué attaché est visualisé en ajoutant le substrat de Tetramethylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques pour le Treponema pallidum dans le spécimen. De l'acid sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA.

## 4. MATÉRIAUX

### 4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts de Treponema pallidum (IgG) :** 12 bandes cassables contenant 8 puits recouvertes d'antigène de Treponema pallidum; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgG \*\*\*\* :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution D'Arrêt :** 1 bouteille contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (20x concentré) \* :** 1 bouteille contenant 50 ml d'un amortisseur 20-fois concentré (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; couvercle blanc.
- **Conjugué Protéine A Treponema pallidum \*\* :** 1 bouteille contenant 20 ml d'protein A conjugués à peroxydase; coloré bleu, prêt à utiliser ; couvercle noir.
- **Solution de substrat de TMB :** 1 bouteille contenant 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ; prêt à utiliser ; couvercle jaune.
- **Contrôle positif d'IgG Treponema pallidum \*\*\* :** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Contrôle cut-off d'IgG Treponema pallidum \*\*\* :** 1 bouteille contenant 3 ml, coloré jaune; prêt à utiliser;couvercle vert.
- **Contrôle négatif d'IgG Treponema pallidum \*\*\*\*:** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle bleu.

\* contient 0.1 % de Bronidox L après dilution

\*\* contient 0.2 % de Bronidox L

\*\*\* contient 0.1 % de Kathon

## 4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couverture autocollante
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de distribution et d'identification

## 4.3. Matériaux et équipement requis

- lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA, équipé pour le mesurage de l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Équipement manuel ou automatique pour rincer les puits
- Pipettes pour usage entre le 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

## 5. STABILITÉ ET STOCKAGE

---

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à 2... 8°C.

## 6. PRÉPARATION DE RÉACTIF

---

*Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à la température de la pièce (20... 25°C) avant de commencer l'analyse!*

### 6.1. Bandes recouvertes cassables

Les bandes cassables sont recouvertes d'antigène de *Treponema pallidum* et sont prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après avoir détaché des bandes, les bandes restantes devraient tout de suite être refermées dans le sachet d'aluminium avec le desiccant fourni et être conservées à 2... 8°C; stable jusqu'à la date d'échéance. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

### 6.2. Conjugué Protéine A *Treponema pallidum*

La bouteille contient 20ml d'une solution avec protéine A, de la peroxydase de raifort, l'amortisseur, les stabilisateurs, les préservatifs et un colorant bleue inerte. La solution est prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.

### 6.3. Contrôles

Les bouteilles marquées avec contrôle positif, contrôle cut-off et contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prêt à utiliser. Elle contient 0.1% Kathon et doit être stockée à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2...8°C.*

### 6.4. Diluant de l'échantillon IgG

La bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant jaune inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prêt à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

### 6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20<sup>ème</sup>; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

### 6.6. Solution de substrat de TMB

La bouteille contient 15ml d'un système de peroxyde de tetramethylbenzidine/hydrogen. Le réactif est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C, loin de la lumière. *La solution devrait être sans couleur ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat se transforme en bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

### 6.7. Solution d'arrêt

La bouteille contient 15ml d'une solution acide sulfurique de 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

## 7. COLLECTION ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

---

Utilisez des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si l'analyse est exécutée dans un délai de 5 jours après la collection de l'échantillon, le spécimen devrait être maintenu à 2... 8°C ; autrement ils devraient être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, mélangez les échantillons décongelés bien avant l'analyse. *Évitez congélation et décongélation répétée.*

L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

### 7.1. Dilution de l'échantillon

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgG.

Diluer 10µl de l'échantillon avec 1ml du diluant de l'échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex.

## 8. PROCÉDÉ D'ANALYSE

---

### 8.1. Préparation d'analyse

Veillez lire le protocole de l'analyse soigneusement **avant d'exécuter** l'analyse. La fiabilité des résultats dépend de l'adhérence stricte au protocole de l'analyse comme décrit. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer l'analyse, le plan de distribution et d'identification pour tous les spécimens et contrôles devrait être soigneusement établi sur la feuille de résultat fournie dans le kit. Choisissez le nombre requis de bandes ou de puits microtitres et insérez-les dans le support.

Veillez assigner au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le substrat blanc,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif et
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

*C'est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient deux fois, si nécessaire.*

Exécutez toutes les étapes de l'analyse dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Une pointe de pipette propre et jetable devrait être employée pour aliquoter chaque contrôle et échantillon.

Ajuster l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipettez 100µl de contrôles et les échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Gardez les puits A1 pour le substrat blanc.
2. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
3. **Incuber pour 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. Quand l'incubation a été accomplie, enlevez la couverture, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300µl de solution de lavage. Évitez les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5sec. À la fin, enlevez soigneusement le fluide restant en tapant les bandes sur des papiers en tissu avant la prochaine étape !
5. Pipettez 100µl du conjugué protéine A *Trponema pallidum* dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermez avec la couverture autocollante.
6. **Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce.** *Ne pas exposer à la lumière du soleil directe.*
7. Répétez l'étape numéro 4.
8. Pipetter 100µl de la solution de substrat de TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité.**
10. Pipetter 100µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat de TMB.

*N'importe quelle couleur bleue développée pendant l'incubation se transforme en jaune.*

*Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de la densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec la solution physiologique de chlorure de sodium, par exemple 1+1. Ensuite diluer l'échantillon 1+100 avec l'amortisseur et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.*

11. Mesurer l'absorption du spécimen à 450/620nm dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

### 8.2. Mesurage

Ajuster le lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA à **zéro** en utilisant **le substrat blanc dans le puits A1.**

*Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorption du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorption mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !*

**Mesurer l'absorption** de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorption pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

*Une lecture bichromatique de longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée.*

En cas de plusieurs mesurages, calculer **les valeurs moyennes d'absorption** de tous les résultats.

## 9. RÉSULTATS

---

### 9.1. Critères De Validité

Afin qu'une analyse soit considérée valide, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200 et < cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1 : Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance > **contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

### 9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple :  $0,37 \text{ DO cont. seuil} + 0,39 \text{ DO cont. seuil} = 0,76 \div 2 = 0,38$

« Cut-off » = 0,38

### 9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorption est plus élevée que 10% au-dessus du « cut-off ».

Des échantillons avec une valeur d'absorption de 10% au-dessus ou au-dessous du « cut-off » ne devraient pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est recommandé de répéter l'analyse après 2 - 4 semaines avec un échantillon frais. Si les résultats de la deuxième analyse sont encore dans la zone grise l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorption est inférieure à 10% au-dessous du « cut-off ».

#### 9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorption du patient x 10 = [ unités NovaTec = NovaTec units= NTU ]  
« cut-off »

Exemple :  $\frac{1,786 \times 10}{0,38} = 47 \text{ NTU}$

« Cut-off » : 10 NTU  
Zone grise : 9-11 NTU  
Négatif : < 9 NTU  
Positif : > 11 NTU

## 10. CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

---

### 10.1. Précision

<u>Intera-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (E)</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	4	2.444	5.1
<u>Intra-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (E)</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	8	2.621	1.5

### 10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >98%.

### 10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >98%.

### 10.4. Interférence

Aucune interférence n'a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu'à 10 mg/ml d'hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0.2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.
---

## 11. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

---

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

## 12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

---

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT :	Dans la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique lors du contact avec la peau et les membranes muqueuses !
-----------------	--

AVERTISSEMENT :	L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. Lors du contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !
-----------------	--

### 12.1. Mesures d'élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L'élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l'élimination des déchets dangereux.

## 13. INFORMATION DE COMMANDES

---

Numéro de Produit : TREG 0470

Treponema pallidum IgG-ELISA (recombinant) (96 déterminations)

## 1. INTRODUZIONE

I Treponemi hanno un diametro di ca. 0,2µm e una lunghezza di 5-20µm, sono avvolti a spirale, mobili, Gram-negativi ed anaerobi obbligati. Il Treponema Pallidum è l'agente eziologico della sifilide. La sifilide è una malattia cronica a trasmissione sessuale. I batteri di solito penetrano nell'organismo attraverso le mucose della vagina o dell'uretra, raramente attraverso ferite o scalfitture della pelle. Attraverso la trasmissione transplacentare i batteri possono contagiare il feto di una donna infetta, con il risultato che il neonato manifesta già in se la malattia (sifilide congenita).

La sifilide si manifesta in tre stadi successivi:

-il **periodo primario**, in cui si manifesta un'ulcera indurita nella sede dell'infezione, un mese circa dopo il contatto infettante. Questo stadio è altamente contagioso.

-il **periodo secondario**, che dura da uno a tre anni, in cui la malattia si generalizza e che si manifesta attraverso lesioni cutanee e delle mucose.

-durante il **periodo terziario**, mesi oppure anni dopo l'inizio della malattia, possono verificarsi accidenti nervosi (neurosifilide), sensoriali e cardiovascolari (sifilide cardiovascolare) che rendono grave questa malattia. In questo stadio la malattia non è più contagiosa. Grazie alla penicillina questi fenomeni sono diventati molto rari.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
Treponema pallidum	Sifilide	ulcera indurita  lesioni cutanee e delle mucose  accidenti nervosi (neurosifilide), sensoriali e cardiovascolari (sifilide cardiovascolare)	Trasmissione: sessuale, transplacentare

Diagnosi

- Microscopia
- Sierologia: ELISA, VDRL, RPR, FTA-ABS test, TPHA

## 2. USO PREVISTO

Il NovaTec Treponema pallidum IgG ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per Treponema pallidum nel siero o plasma (citrato) umano.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgG per Treponema pallidum si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici del Treponema pallidum. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli Proteina A del coniugato (perossidasi di rafano-Proteina A) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il Treponema pallidum di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

## 4. MATERIALI

### 4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del Treponema pallidum (IgG):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del Treponema pallidum; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG\*\*\*:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato Proteina A Treponema pallidum\*\*:** 1 flacone contenente 20 ml di Proteina A, coniugati a perossidasi; color azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Treponema pallidum IgG Controllo positivo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Treponema pallidum IgG Controllo Cut-off\*\*\*:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.

- **Treponema pallidum IgG Controllo negativo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

\* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

\*\* contiene 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contiene 0.1 % Kathon

#### 4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

#### 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

### 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

### 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

*Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!*

#### 6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati del *Treponema pallidum*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

#### 6.2. Coniugato *Treponema pallidum* IgG

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgG umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte azzurro. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

#### 6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

#### 6.4. Tampone diluente IgG

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

#### 6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

#### 6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

#### 6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

Usare campioni di siero o plasma (citrate) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*  
L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

### 7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgG. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

## 8. PROCEDIMENTO

---

### 8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

*È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.*

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

*Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.*

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Proteina A Treponema pallidum in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ ... $25^{\circ}\text{C}$ ).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ ... $25^{\circ}\text{C}$ ) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

*Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1+100 con tampone diluente IgG. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.*

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

### 8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) in **A1**. *Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.*

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

*È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.*

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

## 9. RISULTATI

---

### 9.1. Validazione del test

Il test é valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e< cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza >**Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

### 9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

*Esempio:* Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.59 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.57 = 1.16/2 = 0.58  
 $Cut-Off = \underline{0.58}$

### 9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso é raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato é ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

#### 9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$

*Esempio:*  $\frac{1.856 \times 10}{0.58} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

---

### 10.1. Precisione

<b>Interdosaggio</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>Cv (%)</b>
Siero pos.	4	2.444	5.1

<b>Intradosaggio</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>CV (%)</b>
Siero pos.	8	2.621	1.5

### 10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a >98%.

### 10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a >98%.

### 10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed iterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.
--

## 11. LIMITAZIONI

---

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

## 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

---

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

**ATTENZIONE:** Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

**ATTENZIONE:** L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

### 12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

## 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

---

Numero del prodotto: TREG0470 Treponema pallidum IgG-ELISA (recombinant) (96 determinazioni)

## 1. INTRODUCCIÓN

Los Treponemas son bacterias con forma espiral con 10 a 20 espiras, delgadas (0.2 µm) y 5 a 20 µm de largos. Estas bacterias se mueven en medios líquidos rotando u ondulando. Todas las especies patógenas pertenecen a la familia de los Treponemataceae junto con las Borrelias y las Leptospiras. Treponema pallidum causa la sífilis. La transmisión se produce siempre por contacto con un enfermo, por regla general por el acto sexual. Las puertas de entrada son pequeñas lesiones de la piel y de la mucosa aparentemente sana. Una forma especial presenta la transmisión diaplacentar (Lues connata). Si la infección no provoca el aborto del feto, el neonato presentará lesiones corporales y mentales graves. Se distinguen tres estados de la sífilis:

**Lues I (estado primario):** El afecto primario se desarrolla en el área de occlusión después de un período de incubación de aprox. 3 semanas. Se trata de una induración no dolorosa que, más tarde, se desarrolla hacia una úlcera (chancro venéreo duro) y de la cual se desarrolla el complejo primario cuando los agentes patógenos se disgregan por la vía linfática (linfadenitis). Este estado es muy contagioso y desaparece también sin tratamiento para llevar pasadas 4 semanas al estado de la

**Lues II (estado secundario):** Se produce una exantema y enantema y la infección se generaliza. Las apariencias cutáneas desaparecen sin terapia después de 2 a 3 semanas. El estado II de la Lues puede recidivar siempre de nuevo o quedarse en un estado clínico mudo. Después de meses o años se desarrolla el estado de la

**Lues III (estado terciario):** Este estado ya no es infeccioso. Es peligrosa la formación de granulomas que tienen la consistencia de goma y llevan a la destrucción del tejido. El estado III se manifiesta por mesoartritis luetica, meningitis, parálisis progresiva y tabes dorsalis.

Especies	Enfermedad	Síntomas	Vía de transmisión
Treponema pallidum	Sífilis	Úlcera dura, exantema, procesos crónicos de las vías sanguíneas en el sistema nervioso y la aorta (tabes dorsalis, aneurisma de la aorta)	Transmisión por contacto directo Transmisión sexual Transmisión congénita (placenta)

Las infecciones pueden ser detectadas por:

- Microscopía de campo negro
- Serología: Detección de anticuerpos específicos a través del ensayo TPHA, FTA-ABS, TPI, VDRL y ELISA

## 2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de Nova Tec es para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra Treponema pallidum en suero o plasma (citato) humano.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra Treponema pallidum se basa en la técnica del ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de Treponema pallidum. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmobilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de proteína A con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgG) recubiertas de antígeno de Treponema pallidum:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Treponema pallidum, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgG de la muestra\*\*\*:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado de proteína A (Treponema pallidum)\*\*:** 1 botella de 20ml de conjugado proteína A con peroxidasa; color azul; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgG (Treponema pallidum)\*\*\*:** 1 botella de 2 ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgG (Treponema pallidum)\*\*\*:** 1 botella de 3 ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado

- **Control negativo de IgG (*Treponema pallidum*)\*\*\*:** 1 botella de 2 ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.
- \* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir
- \*\* contiene 0.2% Bronidox L
- \*\*\* contiene 0.1% Catón

#### 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

#### 4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

### 5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

---

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

### 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

---

*Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!*

#### 6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de *Treponema pallidum* están selladas. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

#### 6.2. Conjugado de proteína A (*Treponema pallidum*)

La botella contiene 20ml de una solución de proteína A conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante azul inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.3. Controles

Las botellas contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.4. Tampón de dilución de IgG para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

#### 6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

#### 6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

## 7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

---

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

### 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgG, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. PROCEDIMIENTO

---

### 8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevar el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(p. ej. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(p. ej. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(p. ej. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(p. ej. E1)	para el control positivo

*Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.*

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C**.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

*Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!*

5. Pipetar 100µl de conjugado de proteína A (Treponema pallidum) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C)**. Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C)**.
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

*Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgG 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

### 8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

## 9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

---

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200 y < cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción >**cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

### 9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los volores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = \underline{0.43}$$

### 9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción  $\pm 10\%$  del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas  $\rightarrow$  **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

#### 9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 = [NovaTec-unidades = NTU]

*Cut-Off*

Ejemplo:  $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ NTU (NovaTec unidades)}$

Cut-Off :	10	NTU
Zona intermedia:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

---

### 10.1. Precisión

<b>Inter ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>CV (%)</b>
Serum pos.	4	2.444	5.1
<b>Intra ensayo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>CV (%)</b>
Serum pos.	8	2.621	1.5

### 10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de >98%.

### 10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de >98%.

### 10.4. Interferencias

Las muestras hemolítico, lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 10 mg/ml para hemoglobina, 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

*Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.*

## 11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

---

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

## 12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

---

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

**ADVERTENCIA:** Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

**ADVERTENCIA:** El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

### 12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

## 13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

---

Nº del producto: TREG0470 Treponema pallidum IgG-ELISA (recombinant) (96 determinaciones)












## **BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**

- Ijsselmuiden, O.E., J.J. Sluis, A. Mulder, E. Stolz, K.P. Bolton, and R. Eick. 1989. An IgM capture enzyme linked immunosorbent assay to detect IgM antibodies to treponemes in patients with syphilis. *Genitourinary Medicine* 65: 79-83
- Luger, A., B.L. Schmidt, und F. Gschnait. 1983. Neue Fortschritte der Syphilisserologie. *Wr. Klein. Wsch.* 95: 440-443
- Luger, A., B. L. Schmidt, K. Steyrer, and E. Schönwald. 1981. Diagnosis of neurosyphilis by examination of the cerebrospinal fluid. *Br. J. Ven. Dis.* 57: 232-7
- Müller, F., and E.G. Lindenschmidt. 1982. Demonstration of specific 19S(IgM) antibodies in untreated and treated syphilis. *Br. J. Ven. Dis.* 58: 12-17
- Penn. C. W., M. J. Baily, and Cockayne. 1985. The axial filament antigen of *Treponema pallidum*. *Immunology* 54: 635-641
- Schmidt B. L., G. Steinmetz, and A. Luger. 1985. Long-lasting IgM reactivity in patients with syphilis after adequate treatment: virological and immunological studies. *Advances in Sexually Transmitted Disease* 135-141

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
<b>IVD</b>	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
<b>LOT</b>	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
<b>CE</b>	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
<b>[REF]</b>	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
<b>MTP</b>	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
<b>CONJ</b>	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
<b>CONTROL -</b>	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérüm de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo
<b>CONTROL +</b>	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérüm de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
<b>CUT OFF</b>	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérüm de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
<b>DIL G</b>	Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
<b>SUB TMB</b>	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB
<b>WASHBUF 20x</b>	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

# SCHEME OF THE ASSAY

Treponema pallidum IgG-ELISA (recombinant)

## Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37°C</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 30 min at room temperature</b> Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

## NovaTec Immundiagnostica GmbH

### Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6  
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : [info@NovaTec-ID.com](mailto:info@NovaTec-ID.com)

Internet: [www.NovaTec-ID.com](http://www.NovaTec-ID.com)

TREG0470engl,dt,fr,it,es01092011-CS