



ENZYWELL
TREPONEMA IgG

REF 91050 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/Fabricado por:
DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX / INDICE / CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / UTILISATION / INDICACIONES DE USO/ UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / PROCEDIMIENTO / PROCEDIMENTO DE TESTE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / VALIDATION OF THE TEST / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRECISIÓN / PRECISÃO
16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS /RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / REFERÊNCIAS



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
TREPONEMA IgG**

REF 91050

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI TREPONEMA PALLIDUM NEL SIERO UMANO.

2. INTRODUZIONE

La diagnosi sierologica della Sifilide si effettua stabilendo se ci sono nel siero del paziente anticorpi, a titolo significativo, specifici per il Treponema Pallidum.

Il metodo di riferimento è l'FTA-ABS che consente di rivelare sia le IgG che le IgM. Poiché l'esecuzione è laboriosa e l'interpretazione del test non è agevole, si sono trovati metodi alternativi in grado di semplificare la procedura. L'ELISA fornisce risultati riproducibili e specifici in completa automazione e per questo motivo è proposta da molti utilizzatori.

Molto importante risulta il dosaggio specifico delle IgM divise dalle IgG in quanto aiuta nella diagnosi di Sifilide congenita.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

Un pool di antigeni del T. Pallidum ottenuti con tecnica ricombinante in E. coli viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

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

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con pool di proteine ricombinanti Treponema pallidum.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (SR seguita dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-Treponema IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT OFF 1 x 2 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-Treponema IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi in tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5% .

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

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) contenente proteine 10% p/v e sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

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

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

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.
Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si seccino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

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

dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluire i campioni 1:51 dispensando 20 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI i (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo.

Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µL) si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

Tecnica manuale

STEP 1 Mettere 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip.

-

Incubare 45 min. a 37°C

-

Lavare 4 volte (300 µL)

STEP 2 Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto

-

Incubare 45 min. a 37°C

-

Lavare 4 volte (300 µL)

STEP 3 Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto

-

Incubare 15 min. a t.a.

STEP 4 Aggiungere 100 µL di Stop Solution

-

Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.150) a tutte le altre letture. Il positivo deve avere OD pari almeno a 1,5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere $\leq 0,6$.

La D.O. del cut-off deve essere $\geq 0,2$ a 450 nm e $\geq 0,16$ a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgG specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto fra il valore medio delle O.D. del campione in esame e quello del Cut-off (INDEX). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Il livello delle IgM anti-Treponema pallidum dovrebbe essere determinato usando il kit Enzywell Treponema pallidum IgM. Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG.

Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre indagini diagnostiche.

Esiste la possibilità di reazioni incrociate nei campioni contenenti anticorpi anti-E. coli.

Sebbene i sieri di controllo contenuti nel kit siano calibrati secondo il siero di riferimento della O.M.S., certe discordanze possono osservarsi quando lo stesso siero viene testato con tecniche sierologiche diverse.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 25 sieri di pazienti contenenti anticorpi anti-Borrelia burgdorferi, 12 contenenti anticorpi anti-nucleo (ANA), 12 contenenti anticorpi anti-Epstein Barr Virus. Gli stessi campioni sono stati testati con due altri kit del commercio. In un solo campione (EBV) si è avuta reazione positiva riscontrata in uno dei 2 kit del commercio utilizzati.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 205 campioni provenienti sia da donatori sani sia da sieroteca. Il metodo TPHA è stato usato per confronto, mentre il metodo di riferimento era la tecnica FTA-ABS. 51 campioni risultavano positivi al test TPHA (titolo $\geq 1/160$) e su questi campioni l'accordo fra i due metodi era del 100%.

Dei 24 campioni con titolo 1/80, il metodo ELISA dava risultato positivo in 19 casi; due risultavano dubbi e 3 negativi.

Il metodo di riferimento confermava i 3 sieri negativi trovati in ELISA. I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	74	0
	-	2	129

Il kit Enzywell ha una sensibilità del 97,4% ed una specificità del 100% usando l'FTA-ABS come metodo di riferimento e considerando i risultati dubbi come positivi.

15. PRECISIONE**Precisione nella prova**

Campione	TPG1 (Negativo < Cut off)	TPG 2 (Positivo >Cut off)	TPG 3 (Fortemente positivo)	Cut Off	Controllo Positivo
N. Repliche	24	24	24	12	12
Media D.O.	0.18	0.50	1.14	0.28	1.69
CV %	6.4	14.0	6.2	3.8	3.6

Precisione entro prove

Campione	INDEX		
	Media	Deviazione Standard	CV%
C Pos.	6.52	0.81	12.4
TPG 1	0.58	0.04	6.9
TPG 2	1.73	0.13	7.5
TPG 3	4.53	0.64	14.1

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il

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

17. BIBLIOGRAFIA

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

**RIEDEL
LIESS**
INSTRUCTIONS FOR USE

**ENZYWELL
TREPONEMA IgG**

REF 91050

(English)

1. INTENDED USE

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The serological diagnosis of Syphilis is performed by demonstrating the presence of significant levels of specific *Treponema pallidum* antibodies in the serum sample.

The reference method used is the FTA-ABS technique which allows the detection of both IgG and IgM. However, its execution is laborious and the interpretation of the results is not simple; alternative methods have therefore been introduced to simplify the procedure. ELISA gives completely automated, reproducible and specific results, and for this reason is favoured by many operators.

The specific assay of IgM as opposed to IgG is of particular importance in the diagnosis of congenital Syphilis.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-6).

A pool of *T. pallidum* antigens obtained by recombinant technique in *E. Coli* is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added.

The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

- **Bring to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with a pool of recombinant proteins of *Treponema pallidum*.

Use: open the package at the end opposite the code (SR followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-*Treponema* IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT-OFF CUT OFF CONTROL 1 x 2 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-*Treponema* IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

Contents: monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0,02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L, with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 10 DILUENT 10 (PF93621) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

Contents: PBS containing proteins 10% w/v and sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

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

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

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

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

Health and Safety Information

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

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

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
 - servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

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

samples must be carefully shaken before performing the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results. Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

The test cannot be performed on human plasma.

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Dilute samples 1:51 distributing 20 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control.

Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), add 100 µL of conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well. After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Manual Technique

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample//controls to the wells of the strips.

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µL)

STEP 2 Add 100 µL of conjugate to each well

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µL)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

-

Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

-

Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. VALIDATION OF THE TEST

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6 .

The O.D. of the cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

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

Positive: if the ratio is > 1.2 .

Doubtful: $\pm 20\%$ of the Cut-off.

Negative: if the ratio is < 0.8 .

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

The *Treponema pallidum* IgM level should be determined using Enzywell *Treponema pallidum* IgM kit. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.

The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

There is the possibility of cross reactions if samples contain anti-*E. coli* antibodies.

Although the control sera used in the kit are calibrated to WHO reference serum, certain discordances of results may be observed when the same serum is tested by different serological techniques.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

25 patient's sera containing anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies, 12 containing anti-nuclear (ANA) antibodies, and 12 containing anti-EBV antibodies were tested. The same samples were also tested with two other commercial kits. In only one sample (EBV) was a positive reaction found with one of the other kits used.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 205 samples from either healthy donors or from the serum collection were analysed. The TPHA method was used for comparison, while the reference method was the FTA-ABS technique. 51 samples were positive to the TPHA test (titre $\geq 1/160$), and 100% agreement was found on these samples between the two methods.

Of 24 samples with titre of 1/80, the ELISA method gave a positive result in 19 cases; two were doubtful and 3 were negative. The reference method confirmed the 3 negative samples found with ELISA. The results are summarized in the following table:

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	74	0
	-	2	129

The Enzywell kit offers 97.4% sensitivity and 100% specificity when compared with the FTA-ABS reference method and considering doubtful results as positive.

15. PRECISION

Within run Precision

Sample	TPG1 (Negative < Cut off)	TPG 2 (Positive >Cut off)	TPG 3 (Strongly positive)	Cut Off	Positive Control
N. Replicates	24	24	24	12	12
Media O.D.	0.18	0.50	1.14	0.28	1.69
CV %	6.4	14.0	6.2	3.8	3.6

Between run Precision

Sample	INDEX		
	Media	Standard Deviation	CV%
Pos. Control.	6.52	0.81	12.4
TPG 1	0.58	0.04	6.9
TPG 2	1.73	0.13	7.5
TPG 3	4.53	0.64	14.1

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing

		the plate (see instructions for use, section 4 , for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

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

RIEDEL
BIOSSE
INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL
TREPONEMA IgG

REF 91050

(Español)

1. INDICACIONES

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

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La diagnosis en suero de la Sífilis es realizada demostrando la presencia de los niveles significativos de anticuerpos específicos para Treponema pallidum (TP) en el suero del paciente.

El método de referencia es el FTA-ABS, que permite la detección de IgG e IgM. Pero dado que la ejecución es laboriosa y la interpretación del test no es simple, se han introducido métodos alternativos para simplificar el procedimiento.

La técnica ELISA ofrece resultados automatizados, reproducibles y específicos, y por esta razón muchos operadores la prefieren.

La técnica específica de IgM, opuesta a la de IgG, es de particular importancia en la diagnosis de Sífilis congénita.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-6).

Un pool de antígenos T. Pallidum obtenido por la técnica recombinante en E. Coli se une a la fase sólida (tiras de 8 pocillos). Las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno por medio de incubación con el suero humano diluido. Después de lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, se ejecuta la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales IgG humanos marcados con peroxidasa. Eliminar el conjugado que no se ha unido y añadir el sustrato para peroxidasa.

El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de un pool de proteínas recombinantes de Treponema pallidum

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (SR seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano de concentración conocida de anti-Treponema IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional

Color: el color de los calibradores es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT OFF 1 x 2 mL

Contenido: Suero humano diluido de concentración conocida de anti-Treponema IgG, en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color de los calibradores es proporcional al título del anticuerpo.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Contenido: una solución de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, con fenolo 0,05% y Bronidox 0,02%. Listo para su uso sin dilución adicional.

CONTROL IgG - IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 10 DILUYENTE 10 (PF93621) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución de proteínas (10%) en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

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

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

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

6. PRECAUCIONES DE USO

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

Cuidado:

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

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

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

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

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclicórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
 - instalación y requisitos específicos
 - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
 - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
 - mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

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

La inactivación al calor puede proveer resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.

- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluir las muestras 1:51 poniendo 20 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.

Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.

Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

Método Manual

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/ controles en los pocillos.

-
Incubar 45 min. a 37°C

-
Lavar 4 veces (300 µL)

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

-
Incubar 45 min. a 37°C

-
Lavar 4 veces (300 µL)

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

-
Incubar 15 min. a T.A.

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-
Leer la adsorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces del suero Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 .

La D.O. del cut-off debe ser $\geq 0,2$ a 450 nm e $\geq 0,16$ a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

1. Resultados cualitativos

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgG específicas para el antígeno.

Calcular la relación entre el valor medio de D.O. de la muestra y la del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2 .

No-inmune: si la concentración es < 0.8 .

Dudoso: $\pm 20\%$ del Cut-off.

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

12. LIMITACIONES

Las muestras recogidas durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativas con este procedimiento.

El nivel de las IgM *Treponema pallidum* tendría que ser determinado usando el kit Enzywell *Treponema pallidum* IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.

El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

Existe la posibilidad de reacciones cruzadas si las muestras contienen anticuerpos *E. Coli*. Aunque los sueros de control utilizados en los kits sean calibrados según la referencia WHO, algunas discrepancias de resultado se pueden observar cuando el mismo suero está probado con distintas técnicas serológicas.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se ensayaron 25 sueros de pacientes con anticuerpos anti-*Borrelia burgdorferi*, 12 con anticuerpos anti-nucleares (ANA), y 12 con anticuerpos anti-EB. La misma muestra se ensayó con dos otros kits comerciales. En una única muestra (EBV) hubo una reacción positiva con uno de los kits utilizados.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 205 muestras procedentes de donantes sanos o de la recolección de sueroteca. El método TPHA fue utilizado en comparación, con el método de referencia FTA-ABS. 51 muestras fueron positivas al test TPHA (titulación $\geq 1/160$) y un acuerdo del 100% fue encontrado en estas muestras entre los dos métodos. De 24 muestras con titulación de 1/80, el método ELISA dio un resultado positivo en 19 casos; dos fueron dudosos y 3 negativos. El método de referencia confirmó las 3 muestras negativas detectadas con ELISA.

Los resultados pueden ser resumidos como sigue:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	74	0
	-	2	129

El kit Enzywell ofrece sensibilidad del 97.4% y especificidad del 100%, comparado con el método de referencia FTA-ABS, y considerando los resultados dudosos como positivos.

15. PRECISIÓN**Precisión intra-ensayo**

Muestras	TPG1 (Negativo < Cut off)	TPG 2 (Positivo >Cut off)	TPG 3 (Fuertemente positivo)	Cut Off	Control Positivo
N. Replicados	24	24	24	12	12
Media O.D.	0.18	0.50	1.14	0.28	1.69
CV %	6.4	14.0	6.2	3.8	3.6

Precisión realizada en series

Muestra	INDEX		
	Media	Desviación Estándar	CV%
Control positivo	6.52	0.81	12.4
TPG 1	0.58	0.04	6.9
TPG 2	1.73	0.13	7.5
TPG 3	4.53	0.64	14.1

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se

	secuencia errónea .	hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. REFERENCIAS

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



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL TREPONEMA IgG

REF 91050

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO IMUNO-ENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ANTICORPOS DE CLASSE IGG AO TREPONEMA PALLIDUM NO SORO HUMANO.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O diagnóstico serológico da sífilis é efectuado demonstrando a presença de níveis significativos de anticorpos do *Treponema pallidum* na amostra de soro.

O método de referência utilizado é a técnica FTA-ABS, que permite a detecção de IgG e IgM. Contudo, a sua execução é laboriosa e a interpretação dos resultados não é simples; métodos alternativos foram por isso introduzidos para simplificar o procedimento. O ELISA fornece resultados específicos totalmente automatizados e reproduzíveis, pelo que é preferido por muitos operadores.

Ao contrário do ensaio IgG, o ensaio específico da IgM assume uma particular importância no diagnóstico da Sífilis congénita.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste baseia-se na técnica ELISA (Ensaio de imuno-adsorção enzimática) (1-6).

Um pool de antígenos *T. Pallidum* obtidos através de uma técnica recombinante em *E. Coli* liga-se à fase sólida (tiras de 8 poços). As imunoglobulinas são ligadas ao antígeno por incubação com soro humano diluído.

Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto por anticorpos IgG humanos monoclonais marcados com peroxidase.

O conjugado não ligado é eliminado e o substrato de peroxidase é adicionado.

A cor que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes na amostra de soro.

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

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

MT PLATE MICROPLACA 12 x 8 poços cobertos com proteínas recombinantes do *Treponema pallidum*

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

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-*Treponema* IgG, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1 x 2 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-*Treponema* IgG, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L, com BSA a 1% e azida de sódio líquida a 0,09%, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0,01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3.8). Pronto a usar.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1x100 mL Para diluição de amostras de soro **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante .

Preparação: Pronto a usar.

WASH BUF 10X TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0,5%.

Preparação: dilua o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ a 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

A ficha de segurança MSDS está disponível para ser fornecida ao pessoal laboratorial que assim o solicitar.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo da embalagem

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

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

6. PRECAUÇÕES

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

Cuidado:

Este kit contém materiais de origem humana que foram examinados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o

material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

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

Informação de saúde e segurança

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

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

a) O tampão para enxaguar contém detergentes

b) O conjugado e os controlos contêm fenol

c) O substracto é ácido

d) Os controlos contêm azida de sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas; dilua com grandes quantidades de água para serem eliminados.

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

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

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

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

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

Precauções analíticas

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.

10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha está presente na superfície do líquido antes de a ler.

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

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

13. Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:
- instalação e requisitos particulares
 - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e reparação

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

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

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas devem ser evitadas.

O teste não pode ser executado em amostras de plasma.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Prepare a quantidade necessária de tiras.
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

Dilua as amostras na proporção de 1:51 distribuindo 20 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço (A1) para o branco, que será realizado distribuindo apenas 100 µL da mistura de substrato e 100 µL de solução de paragem.

Coloque numa tira o controlo positivo, o controlo negativo e o controlo directo (cut-off) **NÃO DILUÍDOS** (100 µL em cada poço). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados).

Cubra os poços com película protectora e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (em 300 µL, com 30 segundos de tempo de enxaguamento), junte 100 µL de conjugado a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com película protectora. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído (100 µL/poço).

Após 15 minutos à temperatura ambiente, pare a reacção enzimática com 100 µL de solução de paragem.

Leia a D.O. a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

Deixe o primeiro poço (A1) vazio para o branco

Coloque 100 µL de controlos não diluídos nos poços das tiras.

Coloque 100 µL de amostra diluída/reagente branco nos poços.

Incube durante 45 minutos a 37°C

Lave 4 vezes (300 µL)

Adicione 100 µL de conjugado em cada poço (à excepção do poço A1)

Incube durante 45 minutos a 37°C

Lave 4 vezes (300 µL)

Adicione 100 µL de substrato a cada poço (incluindo o poço A1)

Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente

Adicione 100 µl de solução de paragem (incluindo o poço A1)

Leia a absorvência a 450/620 nm dentro de 30 min.

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

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

A D.O. do Directo deve ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se a adsorção da amostra for superior ao valor directo, a amostra é positiva para a presença de IgG específico.

Calcule a relação entre o valor DO médio da amostra e o do directo. Essa relação é o Índice Directo (COI):

COI= DO da Amostra/DO Directa

A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2 .

Duvidosa: se a relação estiver entre 0.8 e 1.2 ($\pm 20\%$ do Directo)

Negativa: se a relação for < 0.8 .

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

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda de infecção, quando apenas estão presentes anticorpos IgM, pode revelar-se negativa por este procedimento.

O nível de IgM do *Treponema pallidum* deve ser determinado usando o kit *Treponema pallidum* IgM. Em alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias mais tarde deve ser tratada em paralelo para determinar um aumento de nível de anticorpos IgG.

O resultado do teste deve ser usado juntamente com as informações disponíveis da avaliação de outros procedimentos de diagnóstico.

Existe a possibilidade de reacções cruzadas com amostras contendo anticorpos anti-*E. coli*.

Apesar de os soros de controlo usados no kit serem calibrados segundo o soro de referência da OMS, algumas discrepâncias de resultados podem ser observadas quando o mesmo soro é testado por diferentes técnicas serológicas.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testados soros de 25 doentes contendo anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*, 12 soros contendo anticorpos anti-nucleares (ANA) e 12 soros contendo anticorpos anti-EBV. As mesmas amostras foram também testadas com outros kits disponíveis no mercado. Apenas uma amostra (EBV) apresentou uma reacção positiva com um dos outros kits utilizados.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Num ensaio clínico realizado num laboratório hospitalar, analisaram-se 205 amostras provenientes de dadores saudáveis ou de uma colecção de soros. Utilizou-se o método TPHA como termo de comparação, enquanto o método de referência foi a técnica FTA-ABS. 51 amostras foram positivas para o teste TPHA (título $\geq 1/160$) e obteve-se uma concordância de 100% entre os dois métodos relativamente a estas amostras.

De 24 amostras com título de 1/80, analisadas com o método ELISA, 19 obtiveram um resultado positivo, duas obtiveram um resultado duvidoso e três foram negativas. O método de referência confirmou as três amostras negativas obtidas com o ELISA. Os resultados são indicados na tabela seguinte:

	REFERÊNCIA	
	+	-
Diesse +	74	0
-	2	129

O kit oferece uma sensibilidade de 97,4% e uma especificidade de 100%, quando comparado com o método de referência FTA-ABS e considerando os resultados duvidosos como sendo positivos.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaio

Amostra	TPG1 (Negativo < Directo)	TPG 2 (Positivo >Directo)	TPG 3 (Fortemente positivo)	Directo	Controlo Positivo
N. Réplicas	24	24	24	12	12
Médias O.D.	0.18	0.50	1.14	0.28	1.69
CV %	6.4	14.0	6.2	3.8	3.6

Precisão entre ensaios

Amostra	INDICE		
	Médias	Desvio Padrão	CV%
Controlo positivo	6.52	0.81	12.4
TPG 1	0.58	0.04	6.9
TPG 2	1.73	0.13	7.5
TPG 3	4.53	0.64	14.1

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

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

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

17. REFERÊNCIAS

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

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



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-587111