



ENZYWELL

SYPHILIS SCREEN RECOMBINANT

REF 91100 (2 x 96 tests)

REF 91104 (6 x 96 tests)

Manufactured by: DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / CONTENU DU COFFRET ET PREPARATOIN DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / MODALITE DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TYPE D'ECHANTILLON
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / MODE OPERATOIRE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / VALIDATION OF THE TEST / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DES RESULTATS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITES DE LA METHODE
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / SPECIFICITE ANALYTIQUE
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE
15. PRECISIONE / PRECISION
16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / RESOLUTION DES PROBLEMES
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
SYPHILIS SCREEN RECOMBINANT**

REF Cod. 91100 (2 x 96 tests)

REF Cod. 91104 (6 x 96 tests)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELLE IMMUNOGLOBULINE ANTI TREPONEMA PALLIDUM NEL SIERO O PLASMA 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* (TP).

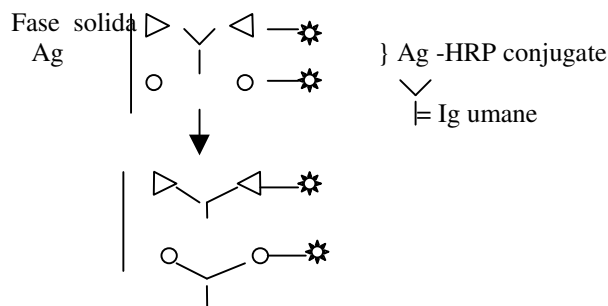
Il metodo di riferimento è l'FTA-ABS, ma poiché l'esecuzione è laboriosa e l'interpretazione del test non è agevole, si sono trovati metodi alternativi in grado di semplificare la procedura.

Il TPHA è il test di elezione quando si tratta di effettuare uno screening in quanto è in grado di rivelare la presenza di Ig anche a basso titolo. Purtroppo il risultato del test è dato con interpretazione soggettiva in quanto il test non può essere completamente automatizzato. Il TPHA è insensibile nella fase primaria.

Il presente kit consente uno screening con tecnica ELISA che rileva la presenza di anticorpi specifici di qualunque classe ed è completamente automatizzabile. L'antigene impiegato si è ottenuto con tecnica ricombinante.

3. PRINCIPIO DEL METODO:

Il kit Syphilis Screen Recombinant si basa sul principio "sandwich", una tecnica di dosaggio immunoenzimatico in fase solida, per la determinazione dei livelli sierici di anticorpi anti-*Treponema pallidum*. Durante l'incubazione gli anticorpi eventualmente presenti si legano all'antigene in fase solida come anche all'antigene marcato con perossidasi (HRP), formando un complesso antigene-anticorpo-antigene-HRP. Il coniugato non legato viene eliminato attraverso lavaggi e l'attività enzimatica legata viene determinata con l'aggiunta di un substrato cromogeno. La colorazione blu che si sviluppa, diventa gialla dopo l'aggiunta della soluzione bloccante. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di anticorpi nel campione.



4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

Il kit da 192 det. (cod. 91100) contiene:

MT PLATE MICROPIASTRA. 2x 96 pozzetti sensibilizzati con antigeni ricombinanti del *Treponema pallidum*.

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

CONTROL - CONTROLLO NEGATIVO (1 mL).

Contenuto: Siero di vitello con fenolo 0.05% e bronidox 0.02%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO (1 mL).

Contenuto: Siero umano diluito in soluzione proteica stabilizzata contenente anticorpi anti *Treponema pallidum*.

CONJ CONIUGATO. 2 x 15 mL.

Contenuto: una miscela di proteine ricombinanti del *Treponema pallidum* marcate con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0.02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 1 x 100 mL. (*intercambiabile tra 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.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 2 x 12 mL. Pronto all'uso (*intercambiabile tra 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). 2 x 15 mL.)

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

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

Il kit da 6 x 96 det. (cod. 91104) contiene:**MT PLATE** MICROPIASTRA. 6x 96 pozzetti sensibilizzati con antigeni ricombinanti del *Treponema pallidum*.

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

CONTROL - CONTROLLO NEGATIVO (2 x 1 mL).

Contenuto: Siero di vitello con fenolo 0.05% e bronidox 0.02%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO (2 x 1 mL).

Contenuto: Siero umano diluito in soluzione proteica stabilizzata contenente anticorpi anti *Treponema pallidum*.

CONJ CONIUGATO. 6 x 15 mL.

Contenuto: una miscela di proteine ricombinanti del *Treponema pallidum* marcate con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0.02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 3 x 100 mL. (*intercambiabile tra 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.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 6 x 12 mL. Pronto all'uso (*intercambiabile tra lotti*)

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

STOP SOLN SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 130 mL. (*intercambiabile tra lotti*)

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

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o a 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
CONTROLLO NEGATIVO	1 SETTIMANA a 15-30°C, 8 settimane a 2-8°C.
CONTROLLO POSITIVO	1 SETTIMANA a 15-30°C, 8 settimane a 2-8°C
CONIUGATO	1 SETTIMANA a 15-30°C, 8 settimane a 2-8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
WASH BUFFER	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
STOP SOLUTION	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

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

Attenzione:

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

Avvertenze per la sicurezza personale

- 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.
- I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - Il coniugato ed i controlli contengono fenolo
 - Il substrato è acido
 Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
- 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.
- 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.
- I rifiuti liquidi, neutralizzati con sostanze alcaline, 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.
- 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
- Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
- Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
- Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
- Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
- 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, plasma contenente fibrina 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 CAMPIONI E CONSERVAZIONE:

Non è richiesta alcuna preparazione particolare del paziente. Si possono usare campioni di siero o plasma. Non sono state osservate interferenze in seguito all'uso di anticoagulanti come citrato, eparina o EDTA. Il campione può essere mantenuto per 7 giorni a 2/8°C. Per conservazioni più lunghe congelare a -20°C. Un ciclo di congelamento/scongelo dei campioni o un'inattivazione al calore per 30 min a 56°C non influenza i risultati.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. Se non è possibile il prelievo di un campione fresco, i campioni dovrebbero essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione (3000 rpm x 10').

8. PROCEDIMENTO

PREPARAZIONE

Preparazione del tampone di lavaggio: 18 mL di acqua distillata + 2 mL di WASH BUFFER 10x per strip

ESECUZIONE DEL TEST

1. Distribuzione dei campioni:

Dispensare 30 µL dei campioni in esame e successivamente 30 µL di controllo negativo e di controllo positivo (in duplicato) nei rispettivi pozzetti.

Aggiungere in tutti i pozzetti 100 µL di coniugato. Miscelare accuratamente.

2. Incubazione:

Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 37°C per 30 minuti min.

3. Lavaggio:

Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con circa 0,3 mL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi ogni volta.

4. Distribuzione del substrato:

Dispensare 100 µL di substrato per ogni pozzetto.

5. Incubazione del substrato:

Incubare la piastra per 10 minuti a temperatura compresa tra 18 e 30°C.

6. Arresto della reazione:

Dispensare 100 µL di soluzione bloccante seguendo lo stesso ordine di aggiunta del punto 4.

7. Lettura:

Leggere fotometricamente entro 30 minuti a 450 nm o a 450/620 nm.

9. Schema del saggio per Syphilis Screen Recombinant

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Mettere il siero campione nei singoli pozzetti, 30 µL di controllo negativo, positivo (in duplicato) e aggiungere 100 µL di coniugato. Miscelare. |
| | - |
| | Incubare 30 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavare 4 volte dispensando 300 µL di tampone di lavaggio e con tempo di attesa di 30 sec. tra erogazione ed aspirazione |
| | - |

- STEP 2 Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
-
Incubare 10 min. a 18-30°C
-
- STEP 3 Aggiungere 100 µL di Stop Solution
-
Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Dosare i Controlli Negativo e Positivo in duplicato.
La O.D. del Controllo negativo deve essere ≤ 0.200
La O.D. del Controllo positivo deve essere ≥ 0.600 ; ≤ 2.000 .

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Calcolo del valore di cut-off

$$\text{Cut-off} = (\text{OD Controllo Negativo} + \text{OD Controllo Positivo})/3$$

Se il valore dell'assorbanza del campione è maggiore del Cut-off, il campione risulta positivo per la presenza di immunoglobuline anti-Treponema pallidum.

12. LIMITAZIONI DEL TEST

Il test non è in grado di discriminare la presenza di IgG da quella delle IgM.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

La specificità analitica è stata studiata testando campioni contenenti fattori potenzialmente interferenti come anticorpi Antinucleari EBV, anticorpi eterofili, anticorpi anti-Borrelia, Fattore Reumatoide (da 40 a 1080 UI/mL), Trigliceridi (≤ 870 mg/dL), Bilirubina (≤ 11 mg/dL), ed emoglobina (≤ 10 mg/dl). In nessun caso il risultato del test veniva alterato.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

E' stato effettuato uno studio su 946 campioni provenienti da una routine di laboratorio. I campioni venivano dosati in parallelo con un kit ELISA disponibile in commercio basato sul principio "a competizione". Sono stati trovati 28 campioni positivi, 6 dei quali in disaccordo fra i due metodi. Questi campioni venivano indagati ulteriormente con il metodo FTA-ABS, preso come metodo di riferimento; 5 sierici venivano confermati come positivi ed uno era negativo. La specificità diagnostica del test in questa sperimentazione è 99,9%.

La sensibilità diagnostica è stata studiata studiando la reazione di 74 campioni positivi per la presenza di immunoglobuline specifiche anti-Treponema pallidum: tutti i campioni risultavano fortemente positivi, dando una sensibilità del 100%,

15. PRECISIONE

1. Ripetibilità (intra-serie)

Dosaggi eseguiti in una stessa serie

Campione	Controllo Negativo	Controllo Positivo
Repliche	24	24
Media D.O.	0.09	1.466
CV %	3.23	10.02

2. Riproducibilità (inter-serie)

Dosaggi eseguiti in 5 serie differenti

Campione	Controllo Negativo	Controllo Positivo
Media	0.098	1.888
CV%	5.37	10.41

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 informazioni tecniche 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	Aspirazione inadeguata 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.

**RIEDEL
LIEBOWITZ**
INSTRUCTIONS FOR USE

**ENZYWELL
SYPHILIS SCREEN RECOMBINANT**

REF Cod. 91100 (2 x 96 tests)

REF Cod. 91104 (6 x 96 tests)

1. INTENDED USE:

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF ANTI-TREPONEMA PALLIDUM IMMUNOGLOBULINS IN HUMAN SERUM OR PLASMA.

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* (TP) antibodies in the serum sample.

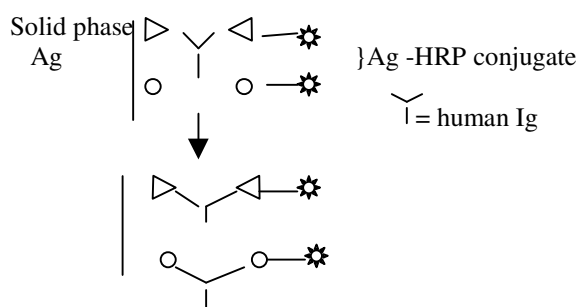
The reference method used is the FTA-Abs technique but its execution is laborious and the interpretation of the results is not simple; alternative methods have therefore been introduced to simplify the procedure.

The TPHA test is the preferred technique for screening purposes, in as far as it detects specific Ig even at low titers. Unfortunately, the result of the test is determined by subjective interpretation as the test cannot be completely automated. The TPHA test is not sensitive in the primary phase.

The present kit allows screening with the sandwich ELISA method. It reveals the presence of specific antibodies of any class, and can be completely automated. The antigen used is obtained by a recombinant technique.

3. PRINCIPLE OF THE TEST:

The Syphilis Screen recombinant test is based on the “sandwich” principle, a solid phase enzyme-linked immunoassay technique, to measure anti-*Treponema pallidum* levels in serum or plasma. During incubation, the antibodies present in the sample are immunologically coupled to the solid phase antigen as well as to the antigen labelled with horse-radish peroxidase (HRP), creating an antigen-antibody-antigen-HRP “sandwich”. The unbound conjugate is eliminated by washing and the bound enzymatic activity is determined by adding a chromogen substrate. The blue reaction which develops turns yellow on addition of the stop solution. The intensity of the colour is proportional to the antibody concentration in the sample.



4. REAGENTS AND REAGENT PREPARATION:

Bring to room temperature before use.

The kit for 2 x 96 tests contains the following materials:

MT PLATE MICROPLATE. 2 x 96 wells coated with recombinant proteins of *Treponema pallidum* antigens.

Use: open the package at the opposite end from the code (SR followed by the lot number) which is necessary for its identification, remove the support and strips to be used from the foil package, and leave the unused strips in the package with the silica gel, expel the air and seal.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL (1 mL).

Contents: Newborn calf serum with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, liquid, ready for use without further dilution.

CONTROL + POSITIVE CONTROL (1 mL).

Contents: Human serum diluted in a stabilizing proteic solution, containing anti *Treponema pallidum* antibodies.

CONJ CONJUGATE. 2 x 15 mL. Ready for use.

Contents: Recombinant proteins of *Treponema pallidum* labelled with Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 mL (**Lot interchangeable**).

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.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619). 2 x 12 mL. Ready for use. (**Lot interchangeable**)

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). 2 x 15 mL. (**Lot interchangeable**)

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

The kit for 6 x 96 tests contains the following materials:

MT PLATE MICROPLATE. 6 x 96 wells coated with recombinant proteins of *Treponema pallidum* antigens.

Use: open the package at the opposite end from the code (SR followed by the lot number) which is necessary for its identification, remove the support and strips to be used from the foil package, and leave the unused strips in the package with the silica gel, expel the air and seal.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL (2 x 1 mL).

Contents: Newborn calf serum with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, liquid, ready for use without further dilution.

CONTROL + POSITIVE CONTROL (2 x 1 mL).

Contents: Human serum diluted in a stabilizing proteic solution, containing anti *Treponema pallidum* antibodies.

CONJ CONJUGATE. 6 x 15 mL. Ready for use.

Contents: Recombinant proteins of *Treponema pallidum* labelled with Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603). 3 x 100 mL (**Lot interchangeable**).

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.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619). 6 x 12 mL. Ready for use. (**Lot interchangeable**)

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

STOP SOLN STOP SOLUTION (PF93602). 1 x 130 mL. (**Lot interchangeable**)

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 at 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes ranging between 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 in the polythene bag
NEGATIVE CONTROL	1 week at 15-30°C, 8 weeks at 2-8°C
POSITIVE CONTROL	1 week at 15-30°C, 8 weeks at 2-8°C
CONJUGATE	1 week at 15-30°C, 8 weeks at 2-8°C
SUBSTRATE	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
WASH BUFFER	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
STOP SOLUTION	until the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS AND WARNINGS:

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE. STORE AT 2-8°C.

Caution:

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

Health and Safety Information

- Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - The Wash Buffer contains detergents
 - The conjugate and controls contain phenol
 - The substrate is acid.
 If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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

- 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.**
- 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.
- 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.
- 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.
- Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
- Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
- Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
- Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
- 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 tht the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid befor reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin 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 OF SPECIMENS AND STORAGE:

No special preparation of the patient is necessary. Serum or plama samples can be used. The use of anticoagulants such as citrate, heparin or EDTA does not interfere in the test. Samples can be stored for 7 days at 2-8°C. For longer storage, freeze at -20°C. Freezing/thawing of the samples or heat inactivation for 30 min at 56°C does not influence the results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation (3000 rpm x 10').

8. TEST PROCEDURE:

PREPARATION

Preparation of the washing buffer: 18 mL of distilled water + 2 mL WASH BUffer 10x per strip.

1. Distribution of the samples:

Dispense 30 µL of the samples being tested and subsequently 30 µl of negative control and positive control (in duplicate), in the respective wells.

Add 100 µL of conjugate to each well. Mix carefully.

2. Incubation:

Incubate the plate covered with the adhesive foil at 37°C for 30 minutes.

3. Rinsing:

Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with about 0.3 mL of washing solution. Wait 30 seconds between each rinse.

4. Distribution of the substrate:

Dispense 100 µL of the substrate in each well.

5. Substrate incubation:

Incubate the plate for 10 minutes at room temperature (18-30°C).

6. Interruption of the reaction:

Dispense 100 µL of stop solution, in the same order as that followed for point 4.

7. Reading:

Take the photometric readings within 30 minutes at 450 nm or at 450/620 nm.

9. TEST PROCEDURE FOR SYPHILIS SCREEN RECOMBINANT
--

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Place serum samples and 30 µL of negative and positive controls (in duplicate) in the wells of the strips and add 100 µL of conjugate. Mix well. |
| | - |
| | Incubate for 30 min. at 37°C |
| | - |
| | Wash 4 times (300 µL) - wait 30 seconds each time |
| | - |
| STEP 2 | Place 100 µL of Substrate in each well |
| | - |
| | Incubate for 10 min. at room temperature (18-30°C) |
| | - |
| STEP 3 | Add 100 µL of Stop Solution |
| | - |
| | Read absorbance at 450 nm within 30 min |

10. VALIDATION OF THE TEST

Test the Negative and Positive Controls in duplicate.

Individual Negative Control values should be ≤ 0.200 .

Individual Positive Control values should be ≥ 0.600 ; ≤ 2.000 .

11. INTERPRETATION OF THE TEST

Calculation of the cut-off value

$$\text{Cut-off} = (\text{OD Negative Control} + \text{OD Positive Control})/3$$

If the absorbance value of the sample is higher than that of the Cut-off, the sample is positive for the presence of anti-Treponema pallidum immunoglobulins.

12. LIMITATIONS

The test is not able to discriminate between the presence of IgG and that of IgM.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

Analytical specificity was studied by testing samples containing potentially interfering factors such as Anti-Nuclear EBV antibodies, heterophile antibodies, Borrelia antibodies, Rheumatoid Factor (from 40 to 1080 IU/mL), Triglycerides (≤ 870 mg/dL), bilirubin (≤ 11 mg/dL), hemoglobin (≤ 10 mg/dl). None of these factors caused interference in the test.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

A study was performed on 946 samples taken from routine laboratory practice. The specimens were tested in parallel by a commercial ELISA kit based on the competitive principle. 28 positive sera were found, of which 6 samples were in disagreement; these were further investigated by FTA-Abs, taken as reference method. Five were confirmed positive, and one was negative. The diagnostic specificity of the test in this experimentation is 99.9%.

The diagnostic sensitivity was investigated by studying the reaction of 74 samples known to be positive for the presence of specific immunoglobulins against Treponema pallidum. All the samples were strongly positive, giving 100% sensitivity.

15. PRECISION**1. Intra-assay reproducibility**

Sample	Negative Control	Positive Control
Repeats	24	24
Average O.D..	0.09	1.466
CV %	3.23	10.02

2. Assays performed in 5 different series

Sample	Negative Control	Positive Control
Average	0.098	1.888
CV%	5.37	10.41

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 package insert point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel desiccant 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. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. S. J. Norris: Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. *Microbiological Reviews*, 1993.
2. P.A. Hanff et al. Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *J. Immunology* 129: 1287 (1982).
3. L. Lewis et al. Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 296 (1990).
4. H. Young et al., Enzywell recombinant enzyme immunoassay for the serological diagnosis of syphilis. *Int. J. STD and AIDS.* 11: 288-291 (2000).

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

