

IVD

Istruzioni per l'uso (Italiano)

1 Destinazione d'uso

recomLine Treponema IgG, IgM è un test qualitativo per la rilevazione degli anticorpi IgG e IgM contro il Treponema pallidum nel siero o nel plasma umano.

2 Campo d'applicazione

recomLine Treponema IgG, IgM può essere impiegato come test di conferma di campioni che hanno reagito in fase di screening. recomLine Treponema IgG, IgM è un Line-Immunoassay. Il principio del test consente, grazie all'allineamento separato dei singoli antigeni e a differenza dei test ELISA, l'identificazione di anticorpi specifici contro i singoli antigeni del Treponema pallidum. Nel test vengono utilizzati antigeni ottenuti per ricombinazione: Tp47, TmpA, Tp257 (Gpd), Tp453, Tp17 e Tp15.

3 Principio di test

Su strisce in membrana di nitrocellulosa vengono fissati antigeni di Treponema ricombinanti altamente purificati.

1. Le strisce sono incubate con il siero o plasma diluito, in modo tale che gli anticorpi specifici si legano agli antigeni del patogeno presenti sulle strisce.
2. Gli anticorpi non legati vengono quindi lavati via.
3. In una seconda fase le strisce vengono incubate con anticorpi anti immunoglobulina umana (IgG o IgM), coniugati con perossidasi di rafano.
4. Gli anticorpi coniugati non legati vengono quindi lavati via.
5. La reazione colorimetrica catalizzata tramite la perossidasi evidenzia gli anticorpi coniugati specifici. Se si è verificata una reazione anticorpi-antigene, nel punto corrispondente compare una banda scura sulla striscia.

Sull'estremità superiore delle strisce ci sono delle bande di controllo:

- a) il controllo di reazione sotto il numero di striscia, che con ogni campione di siero o plasma deve indicare una reazione.
- b) I controlli di coniugato (IgG, IgM) servono a verificare il tipo di coniugati e strisce utilizzati (specifici per la classe Ig). Se le strisce specifiche per IgG vengono usate per la rilevazione di anticorpi IgG, la banda di controllo del coniugato IgG mostra una chiara reazione; in caso di test specifico per IgM la banda di controllo del coniugato IgM deve mostrare una reattività positiva.
- c) "Controllo cutoff": l'intensità di questa banda permette la valutazione della reattività delle singole bande di antigeni (vedere 9.2 Valutazione).

4 Reagenti

4.1 Contenuto della confezione

I reagenti contenuti in una confezione sono sufficienti per 20 (100) determinazioni.

Ogni set di reagenti contiene:

WASHBUF A 10 X	100 ml (5x100 ml) tampone di lavaggio A (concentrato 10X) Contiene tampone fosfato, NaCl, KCl, detergente, agente conservante: MIT (0,1%) e Oxypyron (0,2%)
SUBS TMB	40 ml (5x40 ml) substrato cromogeno tetrametilbenzidina (TMB, pronto all'uso)
MILKPOW	5 g (5x5 g) latte magro in polvere
INSTRU	1 Istruzioni per l'uso
EVALFORM	1 (5) Scheda di valutazione

4.1.1 recomLine Treponema IgG

In aggiunta ai componenti riportati al punto 4.1 ogni set di reagenti contiene:

TESTSTR	2 (10) Provette ognuna con 10 strisce numerate
CONJ IgG	500 µl (5x500 µl) Coniugato IgG antiumano (concentrato 100X, tappo di chiusura verde) Di coniglio, contiene NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) e cloracetamide (<0,1%)

4.1.2 recomLine Treponema IgM

In aggiunta ai componenti riportati al punto 4.1 ogni set di reagenti contiene:

TESTSTR	2 (10) Provette ognuna con 10 strisce numerate
CONJ IgM	500 µl (5x500 µl) Coniugato IgM antiumano (concentrato 100X, tappo di chiusura lilla) Di coniglio, contiene NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) e cloracetamide (<0,1%)

4.2 Reagenti, materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- Camere di incubazione (reperibili in caso di necessità presso MIKROGEN)
- Acqua deionizzata (alta qualità)
- Pinzette di plastica
- Agitatore orizzontale
- Miscelatore a vortice o altri rotatori
- Pompa a vuoto o apparecchio equivalente
- Cilindro di misura, 50 ml e 1000 ml
- Micropipette con siringhe monouso, 20 µl e 1000 µl
- Pipetta o dispenser da 10 ml
- Timer
- Fazzoletti di carta assorbente
- Guanti monouso
- Contenitore per rifiuti organici pericolosi

5 Conservazione e manipolazione

- ☞ Prima e dopo l'uso conservare i reagenti a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C, **non congelare**.
- ☞ Prima di iniziare il test tenere i componenti a temperatura ambiente (+18°C - 25°C) per almeno 30 minuti. Il test viene eseguito a temperatura ambiente.
- ☞ I reagenti uguali (vedi il simbolo stampigliato) di differenti test *recomLine* e *recomBlot* possono essere impiegati per una gamma di parametri e cariche. Osservare la durata di questi componenti.
- ☞ Prima dell'uso miscelare bene i reagenti concentrati e i sieri paziente. Evitare la formazione di schiuma.
- ☞ Aprire le provette contenenti le strisce di test solo prima dell'uso, per evitare la formazione di condensa. Lasciare le strisce non utilizzate nella provetta e riporle nuovamente a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C (chiudere bene la provetta, le strisce di test non devono inumidirsi prima dell'uso!).
- ☞ Le strisce sono contraddistinte dalla numerazione consecutiva e dall'abbreviazione identificativa del test.
- ☞ Sulle confezioni è riportata una data di scadenza, oltre la quale decade la garanzia di qualità del prodotto.
- ☞ Durante l'esecuzione del test proteggere i componenti del test dalla luce diretta del sole. La soluzione di substrato (TMB) è particolarmente sensibile alla luce.
- ☞ Il test deve essere eseguito esclusivamente da personale addestrato e autorizzato.
- ☞ In caso di modifiche sostanziali al prodotto ovvero alle modalità di impiego da parte dell'utente, l'utilizzo può risultare non conforme alla destinazione d'uso stabilita da MIKROGEN.
- ☞ La contaminazione incrociata dei sieri dei pazienti o dei coniugati può condurre a risultati inaccurati. Aggiungere attentamente il campione del paziente, la striscia di test e il coniugato. Fare attenzione che la soluzione di incubazione non fluisca negli altri canali. Prestare particolare attenzione nel rimuovere i liquidi.
- ☞ Le strisce devono essere completamente bagnate e immerse per l'intera durata della procedura.
- ☞ È possibile l'automatizzazione, per ulteriori informazioni rivolgersi a MIKROGEN.

6 Avvertenze e prescrizioni di sicurezza

- ☞ Utilizzare solo per la diagnostica *in vitro*.
- ☞ Tutti gli emoderivati devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.
- ☞ Le strisce di test sono state prodotte con antigeni batterici o virali inattivati.

- ☞ Dopo l'aggiunta del materiale del paziente o del materiale di controllo le strisce devono essere considerate come potenzialmente infettive e quindi trattate di conseguenza.
- ☞ Per l'intera durata dell'esecuzione del test indossare idonei guanti monouso.
- ☞ I reagenti contengono sostanze antimicrobiche e agenti conservanti: azoturo di sodio, MIT (metilisotiazolone), Oxypriron, cloracetamide e perossido di idrogeno. Evitare il contatto con la pelle e con le mucose. In caso di contatto con metalli pesanti come rame e piombo l'azoturo di sodio può formare azoturi esplosivi.
- ☞ Raccogliere tutti i liquidi aspirati. Tutti i contenitori di raccolta devono contenere sostanze disinfettanti adeguate per l'inattivazione degli agenti patogeni umani. Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con idonee sostanze disinfettanti oppure devono essere smaltiti in conformità con le prescrizioni igieniche applicabili. Osservare le istruzioni del produttore relative alla concentrazione e ai tempi di incubazione.
- ☞ Le camere di incubazione sono monouso.
- ☞ Maneggiare le strisce con cura, usando le pinzette di plastica.
- ☞ Non impiegare né mescolare i reagenti con reagenti di altri produttori.
- ☞ Prima di eseguire il test leggere e seguire scrupolosamente tutte le istruzioni per l'uso. La mancata osservanza del protocollo di test riportato nelle istruzioni per l'uso può determinare risultati errati.

7 Prelievo dei campioni e preparazione dei reagenti

7.1 Materiale campione

Il materiale campione può essere siero o plasma (citrato, EDTA, eparina, CPD), che dopo il prelievo deve essere separato dai coaguli sanguigni il più velocemente possibile, per evitare l'emolisi. È assolutamente necessario evitare la contaminazione microbica del campione. Rimuovere le sostanze insolubili dal campione prima dell'incubazione. Si sconsiglia l'uso di campioni inattivati dal calore, itterici, emolitici, lipemici o torbidi.

Attenzione!

Nel caso in cui le determinazioni non vengano eseguite subito, il materiale campione può essere conservato a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C fino a 2 settimane. Per un tempo di conservazione più lungo i campioni devono essere tenuti a una temperatura di -20°C o inferiore. Non è consigliato ripetere le operazioni di congelamento e scongelamento dei campioni: questo può determinare risultati inaccurati.

7.2 Preparazione delle soluzioni

7.2.1 Preparazione del tampone di lavaggio A pronto all'uso

Questo tampone serve sia per la diluizione del siero e del coniugato, sia per le fasi di lavaggio.

Prima di procedere alla diluizione è necessario determinare il volume del tampone di lavaggio A per il relativo numero di test da eseguire. Prima di tutto il latte magro in polvere deve essere sciolto nel tampone di lavaggio A concentrato e solo dopo viene aggiunta acqua deionizzata alla miscela fino a raggiungere il volume finale (diluizione: 1 + 9). La quantità necessaria per un numero definito di strisce è da determinare secondo la seguente formula (il volume morto dell'apparecchio non viene considerato):

Reagente	Formula	Esempio: 5 strisce
Latte magro in polvere [g]	= numero di strisce x 0,1	0,5 g
Tampone di lavaggio concentrato A [ml]	= numero di strisce x 2	10 ml
Acqua deionizzata [ml]	= numero di strisce x 18	90 ml
Tampone di lavaggio A pronto all'uso [ml]	= numero di strisce x 20	100 ml

Il tampone di lavaggio A pronto all'uso può essere conservato per quattro settimane a una temperatura compresa tra +2°C e +8°C. Il tampone di lavaggio A pronto all'uso è inodore e leggermente torbido.

7.2.2 Preparazione delle soluzioni di coniugato

La soluzione di coniugato deve essere preparata poco prima dell'uso, non è possibile conservare una soluzione di coniugato pronta all'uso. Una parte del coniugato concentrato viene diluita con 100 parti di tampone di lavaggio A pronto all'uso (1 + 100).

Le quantità richieste per un numero di strisce definito devono essere determinate matematicamente secondo la seguente formula:

Reagente	Formula	Esempio: 5 strisce
Coniugato concentrato [µl]	= numero di strisce x 20	100 µl
Tampone di lavaggio A pronto all'uso [ml]	= numero di strisce x 2	10 ml

La quantità di coniugato è calcolata senza volume morto. A seconda della procedura (manuale o con strumento) preparare il coniugato in eccesso da 1 a 3 strisce.

8 Procedura di test

8.1 Incubazione del siero per un'ora

Fase	Esecuzione	Nota
1	Prima di iniziare il test tenere tutti i reagenti a una temperatura compresa tra +18°C e +25°C (temperatura ambiente) per almeno 30 minuti.	Il test viene eseguito a temperatura ambiente.
2	Preparare le strisce Immergere le strisce in 2 ml di tampone di lavaggio A pronto all'uso. Importante: Le strisce IgG e IgM non sono intercambiabili!	Non afferrare le strisce con le mani: usare le pinzette. Il numero di striscia è rivolto verso l'alto. A ogni striscia deve corrispondere una cavità della camera di incubazione (vedere 4.2). Le strisce devono essere completamente sommerse.
3	Incubazione dei campioni a) Pipettare 20 µl di campione indiluito (siero umano o plasma) nel canale con ogni striscia. (Diluizione 1 + 100). b) Incubare per 1 ora in agitazione	Pipettare il campione su un'estremità della striscia immersa nel tampone di lavaggio A e mescolare il più velocemente possibile agitando con cura la vaschetta di incubazione. Chiudere la camera di incubazione con il coperchio in plastica e posizionare sullo scuotitore.
4	Lavaggio a) Rimuovere attentamente il coperchio in plastica dalla vaschetta di incubazione. b) Aspirare gentilmente il siero diluito da ogni canale. c) Pipettare 2 ml di tampone di lavaggio A pronto all'uso in ogni canale, lavare per 5 min in agitazione e poi aspirare tutto il tampone di lavaggio A.	Eseguire la procedura di lavaggio 8.4a-8.4c in totale tre volte. Evitare la contaminazione incrociata. In caso di elaborazione a macchina osservare le indicazioni del produttore dell'apparecchio a questo proposito.
5	Incubazione con il coniugato Aggiungere 2 ml di coniugato pronto all'uso e incubare per 45 minuti in agitazione.	Chiudere la camera di incubazione con il coperchio in plastica e posizionare sullo scuotitore.
6	Lavaggio vedi sezione 8.4	Eseguire la procedura di lavaggio in totale tre volte (vedi sezioni 8.4a-8.4c)
7	Reazione con il substrato Aggiungere 1,5 ml di soluzione substrato pronto all'uso e incubare per 8 minuti in agitazione.	
8	Stop della reazione Rimuovere la soluzione di substrato Lavare almeno 3 volte rapidamente con acqua deionizzata.	
9	Asciugare le strisce Prima della valutazione lasciar asciugare le strisce per 2 ore tra 2 strati di carta assorbente.	Prelevare le strisce dall'acqua con cura, usando le pinzette di plastica. Conservare le strisce al riparo dalla luce.

Attenzione!
La soluzione di incubazione non deve traboccare negli altri canali. Devono essere evitati spruzzi specialmente quando si apre e chiude il coperchio.

8.2 Incubazione del siero per tre ore

In alternativa è possibile eseguire il test incubando il siero per tre ore. L'esecuzione si differenzia solo nei punti 3a) e 3b) dalla procedura descritta nella sezione 8.1.

3	Incubazione dei campioni a) Pipettare 10 µl di campione indiluito (siero umano o plasma) nel canale con ogni striscia. (Diluizione 1 + 200). b) Incubare per 3 ore in agitazione	Pipettare il campione su un'estremità della striscia immersa nel tampone di lavaggio A e mescolare il più velocemente possibile agitando con cura la vaschetta di incubazione. Chiudere la camera di incubazione con il coperchio in plastica e posizionare sullo scuotitore.
---	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

9 Risultati

Attenzione

Non utilizzare l'interpretazione automatica senza osservare le indicazioni seguenti per l'interpretazione.

9.1 Validazione – controllo qualità

La valutazione del test può essere eseguita quando i seguenti criteri vengono soddisfatti:

1. banda di controllo reazione (linea superiore) chiaramente colorata, banda scura
2. classe di anticorpi (seconda banda): la banda di controllo del coniugato IgG o IgM deve mostrare una netta colorazione.
3. Controllo cutoff (terza banda): colorazione debole, ma visibile

9.2 Valutazione

La valutazione delle strisce può essere di tipo visivo oppure assistita da computer utilizzando il software di interpretazione *recomScan*). Il software *recomScan* è studiato per supportare l'interpretazione delle strisce. Ulteriori informazioni e relative istruzioni per le analisi assistite da computer sono disponibili presso il Vostro rivenditore di prodotti MIKROGEN. Le istruzioni di seguito servono per l'analisi di tipo visivo.

9.2.1 Valutazione dell'intensità di banda

1. Annotare sulla scheda di valutazione la data, il numero del gruppo così come la classe di anticorpo.
2. Inserire il numero identificativo del campione sulla scheda di valutazione.
3. Incollare la corrispondente striscia nell'appropriato campo della scheda di valutazione utilizzando una colla in stick. Porre la striscia con la banda di controllo della reazione allineata con la linea marcata. Utilizzare un nastro adesivo trasparente per fissare le strisce sulla sinistra della linea marcata (non fissare sulla banda di controllo della reazione!). Incollando l'intera striscia utilizzando colla o nastro adesivo può comportare cambi di colore delle bande.
4. Identificare ora le bande delle strisce di test sviluppate in base alle strisce di controllo stampate sulla scheda di valutazione e inserirle nella scheda stessa. Utilizzando la Tabella 1, valutare l'intensità di ogni banda corrispondente ad ogni classe di immunoglobuline.

Tabella 1: Valutazione dell'intensità di banda in relazione alla banda di cutoff

Intensità cromatica delle bande	Valutazione
Nessuna reazione	-
Intensità molto debole (inferiore alla banda di cutoff)	+/-
Intensità debole (equivalente alla banda di cutoff)	+
Intensità forte (superiore alla banda di cutoff)	++
Intensità molto forte	+++

9.3 Interpretazione dei risultati di test

I criteri per l'interpretazione dei test devono essere desunti dalla Tabella 2.

Tabella 2: Interpretazione del test

Risultato del test	Criteri
Negativo	nessun antigene \geq Cutoff
Dubbio	solo un antigene (a scelta) \geq Cutoff
Positivo	almeno due antigeni a scelta \geq Cutoff

10 Limiti del metodo, limitazioni

- I risultati di test sierologici devono essere sempre considerati nel contesto di altre valutazioni mediche del paziente. Le conseguenze terapeutiche dei rilevamenti sierologici devono essere determinate in considerazione dei dati clinici.
- Per l'interpretazione dei risultati del test è significativa la discussione sulle possibili reazioni incrociate. La specie *Treponema*, come la specie *Borrelia*, appartiene alla famiglia delle spirochetacee. In letteratura vengono descritti anticorpi con reazioni incrociate contro antigeni parziali che sono comuni alla famiglia delle spirochetacee (4).
Anticorpi con reazioni incrociate contro gli antigeni usati in *recomLine Treponema Tp47, TmpA, Tp257 (Gpd), Tp453, Tp17 e Tp15* non vengono descritti. In questo caso si tratta di caratteristici antigeni di *Treponema pallidum* che non indicano reattività in presenza di sieri positivi alla *Borrelia*.
- Un risultato negativo del test *recomLine Treponema* non può escludere un'infezione da *Treponema pallidum*. In caso di dubbio clinico di infezione da *Treponema pallidum* e di rilevamento sierologico negativo, eseguire un secondo test e un secondo prelievo di campione dopo quattro settimane.

- Un risultato positivo per IgG e/o IgM non indica necessariamente la presenza di una patologia attiva in corso.
- **Strisce scure:** Alcuni campioni del paziente possono determinare la formazione, sull'intera striscia di nitrocellulosa, di una colorazione scura, lineare o a disegni. Diversi fattori in ogni siero di un paziente sono responsabili di ciò. La valutazione di queste strisce è solitamente possibile in parte. Così bande "inverse" (bande bianche su sfondo scuro) per esempio dovrebbero essere valutate come negative. Il rispettivo siero dovrebbe essere sempre esaminato utilizzando altri metodi sierologici.

11 Caratteristiche di prestazione

11.1 Sensibilità diagnostica

recomLine Treponema	Precedenti risultati positivi in due test di riferimento			
	Elaborazione di 1 ora		Elaborazione di 3 ore	
	IgG (n=280)	IgM (n=90)	IgG (n=39)	IgM (n=38)
Negativo	0	0	0	0
Dubbio	2	7	1	0
Positivo	278	83	38	38
sensibilità	100%*	100%*	100%*	100%

* compresi i risultati dubbi.

11.2 Specificità diagnostica

recomLine Treponema	Donatori di sangue			
	Elaborazione di 1 ora		Elaborazione di 3 ore	
	IgG (n=200)	IgM (n=199)	IgG (n=40)	IgM (n=40)
Negativo	199	196	40	38
Dubbio	1	3	0	2
Positivo	0	0	0	0
specificità	99,5%	98,5%	100%	95%

11.3 Specificità analitica

La specificità analitica viene definita come la capacità del test di determinare con precisione gli analiti in presenza di potenziali fattori di interferenza nella matrice del campione oppure reazioni incrociate con anticorpi potenzialmente interferenti.

a) **Interferenze:** studi di controllo di fattori potenzialmente interferenti hanno mostrato che la prestazione del test non è stata influenzata da anticoagulanti (CPD, citrato di sodio, EDTA, eparina), emolisi (fino a 1.000 mg/dl di emoglobina), lipemia, bilirubinemia (fino a 20 mg/dl di bilirubina) oppure da cicli di congelamento e scongelamento del campione.

b) **Reazioni incrociate:** negli studi di controllo sono state studiate le interferenze potenziali degli anticorpi contro altri organismi (*Borrelia burgdorferi*, HCV, HIV). Inoltre sono state studiate le condizioni riconducibili a un'attività atipica del sistema immunitario (autoanticorpi antinucleari, fattore reumatoide, gravidanza, infezione da Herpesvirus recente ad esempio EBV*).

* In infezione acuta da EBV può portare ad una non-specifica reattività IgM in *recomLine Treponema IgM* (ad esempio, stimolazione policlonale).

12 Bibliografia

1. Hagedorn HJ Treponemen. Laboratoriums Medizin, Diagnostische Bibliothek 1997, 49, 1-8
2. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin. Microbiol. Rev. 1995, 8(1), 1-21
3. Norris SJ and the Treponema Pallidum Polypeptide Research Group Polypeptides of Treponema pallidum: Progress toward Understanding Their Structural, Functional, and Immunologic Roles. Microbiol. Rev. 1993, 57(3), 750-79
4. Alfen I, Wellensiek HJ Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. Lab. Med. 1994, 18, 12-19
5. Sambri V., et al, Western Immunoblotting with Five Treponema pallidum Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001 (8), Nr. 3: 534-539
6. Van Voorhis W. C., et al, Serodiagnosis of Syphilis: Antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by Treponema pallidum, Journal of Clinical Microbiology, Aug. 2003, 41/8, 3668-3674
7. Robert Koch Institut, Syphilis in Deutschland im Jahr 2006 und Trends seit 2001, Epidemiologisches Bulletin, Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health; 20. Juli 2007 / Nr. 29

Su richiesta saremo lieti di inviarti la documentazione complementare sulla diagnostica del *Treponema*.

13 Spiegazione dei simboli

	Contiene reattivi sufficienti per <n> determinazioni Numero degli inserimenti
EVALFORM	Scheda di valutazione
INSTRU	Istruzioni per l'uso
	Osservare le istruzioni per l'uso
CONT	Contenuto, contiene
IVD	Test in vitro
LOT	Numero di lotto/versione
	Non congelare
REF	Numero di catalogo
	Utilizzare entro Data di scadenza
	Conservare a una temperatura compresa tra x°C e y°C
	Fabbricant

14 Dati sul produttore e sulla versione

recomLine Treponema IgG	Articolo n 5172 (5170)
recomLine Treponema IgM	Articolo n 5173 (5179)
Istruzioni per l'uso	GARLTP004IT
valido da	2023-03
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de
	



GARLTP004