





















SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM

Spotimmunoassay zum qualitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen 4 *Treponema pallidum*-spezifische Antigene in Serum oder Plasma humanen Ursprungs

REF	SP-010-4 M-S6		48
REF	SP-010-4 M-S12		96
REF	SP-010-4 M-S24		2 x 96
IVD	In-vitro-Diagnostikum		CE



Seramun Diagnostica GmbH • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
 T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

 UDI Eindeutige Produktidentifizierung	 IVD In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	 SN Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	 REF Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	 LOT Chargennummer
 Ausreichend für <i>n</i> Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 ! Achtung

Zweckbestimmung

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM ist ein IVD-Test zur qualitativen Bestimmung von Antikörpern des IgM-Isotyps gegen *Treponema pallidum*-spezifische Antigene TmpA, Tpp15, Tpp17 und Tpp47 in Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Der Test wird in Kombination mit dem Gerät Seramun SpotSight® plate mono / Seramun SpotSight® strip zur Bildaufnahme und der Software Seramun SpotSight® scan zur Bildanalyse angewendet.

Er dient der Diagnosehilfe von Syphilis in Proben von Patienten mit Verdacht auf eine *Treponema pallidum*-Infektion oder zur Bestätigung nach einem positiven oder fraglichen Syphilis-Suchtest.

Der Test darf nicht verwendet werden mit anderen Probenmaterialien als Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs, zu Diagnose, Überwachung, Screening, Vorhersage, Prognose, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung, durch Laienanwender und in der Transplantationsmedizin zum Nachweis von übertragbaren Agenzien in Blut, Blutkomponenten, Zellen, Geweben, Organen oder Bestandteilen davon.

Testprinzip

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM ist ein Festphasenimmunoassay (Spotimmunoassay) basierend auf der Verwendung rekombinanter, gereinigter Antigene, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96-well Mikrotiterplatten fixiert sind und die als Fänger-moleküle für Antikörper gegen Tpp15, Tpp17, Tpp47 und TmpA dienen. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch Waschschriffe entfernt und spezifisch gebundene Antikörper mittels Peroxidase (HRP)-markierten anti-human IgM-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausbilden, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitation des Substrats. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 min in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Kavitäten mit verdünntem Waschpuffer.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 min mit HRP-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgM-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3-maliges Waschen der Kavitäten mit verdünntem Waschpuffer.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 min mit Substrat SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen des Substrates. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die entwickelten Arrays sind bis zur Bildanalyse lichtgeschützt aufzubewahren.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2 x 96 Bestimmungen	
1	WELLS	Mikrotiterplatte (Kavitäten mit Arrays) <i>Treponema pallidum</i> -spezifische Antigene und Kontrollen als Spots in Arrayformat immobilisiert	6 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung weiß vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung weiß vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2 x 12 teilbare 8er-Streifen im Rahmen Farbmarkierung weiß vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe	100 mL Konzentrat für je 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe	2 x 100 mL Konzentrat für je 1000 mL Lösung farblos weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent B	55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe	2 x 55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe	4 x 55 mL gebrauchsfertig rot gefärbt schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgM	Konjugat anti-Human IgM-HRP Konjugat (Schaf)	8,0 mL gebrauchsfertig grün gefärbt grüne Kappe	8,0 mL gebrauchsfertig grün gefärbt grüne Kappe	2 x 8,0 mL gebrauchsfertig grün gefärbt grüne Kappe
5	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe	8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe	2 x 8,0 mL gebrauchsfertig farblos blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2 Stück	2 Stück	4 Stück
7	SWAB	Tupfer 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3 x 2 Stück	6 x 2 Stück	12 x 2 Stück
8		Analysenzertifikat	1 Stück	1 Stück	1 Stück
9		Gebrauchsanleitung	1 Stück	1 Stück	1 Stück

Verwendete Antigene

Bezeichnung	Beschreibung	Spezifität
Tpp15	<i>Treponema pallidum</i> protein 15	Die aufgeführten Antigene sind hochspezifisch für alle Infektionsstadien.
Tpp17	<i>Treponema pallidum</i> protein 17	
Tpp47	<i>Treponema pallidum</i> protein 47	
TmpA	<i>Treponema</i> membrane protein A	

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • verstellbare 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten • Reagenzienbehälter für Mehrkanal-Mikropipetten • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung • Teströhrchenständer • Mikrotiterplatten-Waschgerät • Laborsystem Seramun SpotSight® plate mono / strip Scanner mit angeschlossenem PC (Auswertesoftware Seramun SpotSight® scan) • deionisiertes Wasser • fusselfreies Filterpapier • Stoppuhr • Auffanggefäße für infektiöse und nicht-infektiöse Lösungen • lichtundurchlässige Abdeckung (Substrat-Reaktion)

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Probenpuffer, Waschpuffer und Substrat erlaubt.

Alle im Zusammenhang mit dem SeraSpot® Treponema-4 IgM auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder der Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Testkomponenten bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen!

Bei größeren Probenreihen empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Nicht korrekte Probenverdünnung, nicht korrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von **Luftblasen** beim Pipettieren der Proben und / oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Beschädigte Arrays durch **Kratzer** auf dem Boden der Kavitäten sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln mit dem im Kit enthaltenen Tupfer zu reinigen!

Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten können anhaftende Fasern zu fehlerhaften Resultaten führen. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Sicherheitshinweise

Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

WELLS	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
DIL	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
	EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
	-	Enthält Material tierischen Ursprungs.
CONJ HRP IgM	Gefahrbestimmende Komponente	N-Methyl-2-pyrrolidon; 1-Methyl-2-pyrrolidon
	EUH208	Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Nur für gewerbliche Anwender.
	H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
	P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
	P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
	P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P501	Inhalt / Behälter gemäß den geltenden lokalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.	
-	Enthält Material tierischen Ursprungs.	
SWAB	Gefahrbestimmende Komponente	2-Propanol; Isopropylalkohol; Isopropanol
	H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
	H319	Verursacht schwere Augenreizung.
	H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
	P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
	P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz / Gehörschutz tragen.
	P304+P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
	P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. In einer frühen Infektionsphase ist es möglich, dass Antikörper noch nicht oder in nicht nachweisbaren Mengen vorhanden sind.

Kontaminationen der Reagenzien oder der Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

In seltenen Fällen können Proben Antikörper gegen BSA (Rinderserumalbumin) und / oder AGE (advanced glycation end products) enthalten, die unspezifische Reaktionen hervorrufen können, so dass das Testergebnis durch die Software Seramun SpotSight® scan als „nicht auswertbar“ („n.a.“) bewertet wird.

Behandlung der Proben

Probennahme

Serum oder Plasma (Citrat, EDTA, Heparin) humanen Ursprungs in geeignetem Gefäß sammeln.

Probenthaltbarkeit und -lagerung

Serum- oder Plasmaproben humanen Ursprungs maximal 7 Tage bei 2...8 °C lagern. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei < -15 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Vor der Verwendung die Proben auf Raumtemperatur erwärmen und durch kurzes Aufschütteln die Homogenität sichern.

Proben mit Probenpuffer 1 : 101 (v/v) in einem Teströhrchen (zusätzlich benötigtes Hilfsmittel) verdünnen.

Beispiel: 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Mikrotiterstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zu 1 Monat verwendbar.

Reagenzienvorbereitung

Die **Mikrotiterplatte** mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung **erst nach Erreichen der Raumtemperatur**. Nicht gebrauchte Streifen vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser. Der verdünnte Waschpuffer ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen!

Das **Substrat** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen. Sollte das Substrat dunkel gefärbt sein oder Partikel aufweisen, darf dieses nicht mehr verwendet werden.

Testdurchführung

Die Durchführung erfolgt bei Raumtemperatur (RT, 18...25 °C). **Alle** gebrauchsfertigen Testreagenzien, der verdünnte Waschpuffer und Mikrotiterplatte **auf Raumtemperatur erwärmen**.

Alle Reagenzien vor Gebrauch durch leichtes Schütteln mischen, Schaumbildung vermeiden.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Waschgerätes erfolgen.

Wichtige Hinweise zur Testdurchführung:

Mechanischer Kontakt (**Kratzen**) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Waschgerät-Nadeln ist zu **vermeiden**. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!

Alle Flüssigreagenzien (verdünnte Probe, Konjugat und Substrat) sind **blasenfrei** in die Kavitäten einzubringen!

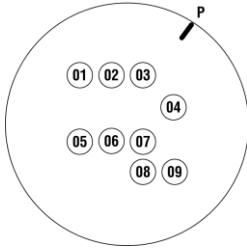
1. Benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** entsprechend der Probenanzahl bereitstellen.
2. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Probe: 1 : 101 Verdünnung
z.B. 10 µL Probe + 1000 µL Probenpuffer **DIL**
3. **100 µL** verdünnte Probe pro Kavität pipettieren.
4. Kavitäten mit Abdeckfolie **COVER** abkleben und **30 min** bei RT inkubieren.
5. Lösung absaugen. Kavitäten **3x** mit jeweils **400 µL** verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
6. **50 µL** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgM** (anti-Human IgM-HRP) pro Kavität pipettieren.
7. Kavitäten mit Abdeckfolie **COVER** abkleben und **30 min** bei RT inkubieren.
8. Lösung absaugen. Kavitäten **3x** mit jeweils **400 µL** verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
9. **50 µL** des gebrauchsfertigen Substrats **SUBSTR** pro Kavität pipettieren.
10. Kavitäten abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
11. Substrat absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
12. Vor der Bildaufnahme die Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
13. **Bildaufnahme** der Kavitäten mit dem Laborsystem Seramun SpotSight® plate mono / strip und Bildanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan.

Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Plattenrahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Nach dem Absaugen des Substrats sind die entwickelten Spots bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 h stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Antigene

- 04 TmpA
- 05 Tpp15
- 06 Tpp17
- 07 Tpp47

Kontrollen

- 01 Positivkontrolle (PC)
- 02 Cut-off Kontrolle (CO)
- 03 Negativkontrolle (NC)
- 08 IgM Konjugatkontrolle (MC)
- 09 Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Qualitative Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameterspezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Färbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe in der Kavität befunden hat. Ein Ausbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf Fehlen von Probe hin.
5. IgM Konjugatkontrolle (MC). Intensiv gefärbter Spot. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eines der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung des Laborsystems Seramun SpotSight® plate mono / strip in Kombination mit der Software Seramun SpotSight® scan.

Die Ergebnisse werden wie folgt interpretiert:

Bewertung	Bedingungen
Positiv	Farbintensität von mindestens zwei Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle
Grenzwertig	Farbintensität eines Antigen-Spots > Cut-off Kontrolle
Negativ	Farbintensität der Antigen-Spots ≤ Cut-off Kontrolle

Leistungsmerkmale

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM untersucht und die Farbintensitäten der Spots (RAW) gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurden die Variationskoeffizienten (VK) als Maß für die Präzision innerhalb eines Testlaufs (Intra-Assay-VK), zwischen verschiedenen Testläufen (Inter-Assay-VK) und zwischen verschiedenen Testchargen (Lot-zu-Lot-VK) ermittelt.

Antigen	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient		Lot-zu-Lot-Variationskoeffizient	
	\bar{x} RAW n = 8	VK [%]	\bar{x} RAW n = 48	VK [%]	\bar{x} RAW n = 144	VK [%]
TmpA	69,5	10,9	59,7	12,1	66,1	11,5
Tpp15	72,0	9,8	48,2	10,7	79,8	13,3
Tpp17	111,7	8,2	76,6	8,5	116,8	10,3
Tpp47	50,9	9,1	74,4	12,5	56,0	16,6
Durchführung	1 Bearbeiter 8 x Bestimmungen 1 Charge		1 Bearbeiter 8 x Bestimmungen 2 x Durchführungen pro Tag 3 Tage 1 Charge		1 Bearbeiter 8 x Bestimmungen 2 x Durchführungen pro Tag 3 Tage 3 Chargen	

Festlegung der Grenzwerte

Der Cut-off Bereich wird testspezifisch festgelegt.

Interferierende Substanzen

Alle getesteten Substanzen haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Testergebnisse, wenn sie in stark erhöhten Konzentrationen im Serum vorhanden sind: Bilirubin C und F (Simulation ikterischer Proben) je 20 mg/dL; Hämoglobin (Simulation hämolytischer Proben) 500 mg/dL, Lipide (Triglyceride) (Simulation lipämischer Proben) 1000 mg/dL und Rheumafaktor 500 IU/mL.

Kreuzreaktivität

51 Serumproben von Schwangeren wurden im SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM untersucht. Es wurden 2 dieser Proben positiv bestimmt (Initiale Spezifität 96,1 %). 1 Probe wurde in einem 2. Referenztest positiv bestätigt (Berichtigte Spezifität 98,0 %).

Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden n=203 vorcharakterisierte Proben untersucht. Die Sensitivität wurde im Vergleich zu Referenztesten im SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM bestimmt. Proben mit diskrepanten Ergebnissen wurden in einem zweiten Referenztest nachgetestet.

IgM	Referenztest	
	positiv	negativ
SeraSpot®	90	7
	4	102
Proben gesamt	94	109
Sensitivität*:	95,7 %	

*Grenzwertige Proben wurden positiv bewertet.

Spezifität

Zur Bestimmung der Spezifität wurden n=382 Blutpenderseren untersucht. Die Spezifität wurde im Vergleich zu Referenztesten im SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM bestimmt. Proben mit diskrepanten Ergebnissen wurden in einem zweiten Referenztest nachgetestet.

IgM		Referenztest	
		positiv	negativ
SeraSpot®	positiv	3	5
	negativ	0	374
Proben gesamt		3	379

Spezifität*: 98,7 %

*Grenzwertige Proben wurden positiv bewertet.

Applikation

Automatische Abarbeitung





Die vergleichenden Untersuchungen per Hand verdünnter positiver Proben zwischen manueller und automatischer Abarbeitung zeigen, dass die Abarbeitung des SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM am Mikrotiterplatten-Prozessor möglich ist. Daten wurden mit dem Gerät DS2® (Dynex Technologies) erhoben. Für die erstellte lineare Regressionsgerade wurde ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,9$ für alle Antigene (Tpp15, Tpp17, Tpp47 und TmpA) erreicht.

Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-10_v01_DE_EN	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen der Sicherheitshinweise Wegfall Pipettierschema
	Gesamtes Dokument	Aktualisierung von Formulierungen und Korrektur von Schreibfehlern












SeraSpot[®] Anti-Treponema-4 IgM

Spot immunoassay for the qualitative detection of IgM antibodies against 4 *Treponema pallidum* specific antigens in serum or plasma of human origin

REF	SP-010-4 M-S6		48
REF	SP-010-4 M-S12		96
REF	SP-010-4 M-S24		2 x 96
IVD	In-vitro-diagnostic medical device		



Seramun Diagnostica GmbH • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

IVD In-vitro diagnostic medical device	UDI Unique device identifier	 Manufacturer
 Country of manufacture and date of manufacture	REF Article number	SN Serial number
 Keep away from sunlight	 Humidity limitation	LOT Batch code
 Consult instructions for use	 Temperature limit	 Do not reuse
 Sufficient for <i>n</i> tests	 Biohazard	 Use-by date
		 Attention

Intended Use

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM is an IVD test for the qualitative determination of antibodies of the IgM isotype against *Treponema pallidum* antigens TmpA, Tpp15, Tpp17 and Tpp47 in serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin by a laboratory professional user.

The test is used in combination with the Seramun SpotSight® plate mono / Seramun SpotSight® strip device for image acquisition and the software Seramun SpotSight® scan for image analysis.

It is intended to aid in the diagnosis of syphilis in specimen materials from patients with suspicion of a *Treponema pallidum* infection or for confirmation following a positive or questionable syphilis screening test.

The test must not be used with specimen materials other than serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin, for diagnosis, monitoring, screening, prediction, prognosis, as companion diagnostic, in the near patient setting, by lay persons and in transplantation medicine for the detection of transmissible agents in blood, blood components, cells, tissues organs or any of their derivatives.

Principle of the Test

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM is a solid phase immunoassay (spot immunoassay) using recombinant, purified antigens printed in array format (spot array) on the bottom of wells of 96-well microtiter plates. Antibodies will bind to the immobilized antigens Tpp15, Tpp17, Tpp47 and TmpA. After incubation and wash steps bound antibodies are detected by horseradish peroxidase (HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgM-isotype by substrate reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide. Blue spots indicate the formation of immune complexes. Spots range from pale to dark blue and are visible by eye.

Detection of Specific Antibodies is Performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 min at room temperature in selected wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with diluted wash buffer.

Step 2

Incubation of wells with the HRP-labeled anti-Human IgM for 30 min at room temperature. Removal of unbound conjugate antibodies by aspiration and 3 wash cycles with diluted wash buffer.

Step 3

Incubation of wells with substrate SeramunBlau® spot dark for 30 min at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate, followed by tapping the plate / strip dry onto lint-free absorbent paper. The developed arrays are to be stored light-protected until image analysis.

Test Components (Delivery Scope)

			For 48 determinations	For 96 determinations	For 2 x 96 determinations
1	WELLS	Microtiter plate (wells with arrays) <i>Treponema pallidum</i> -specific antigens and controls immobilized as spots in array layout	6 single breakable 8-well strips in frame color coding: white vacuum sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame color coding: white vacuum sealed with desiccant	2 x 12 single breakable 8-well strips in frame color coding: white vacuum sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL buffer colorless white cap	100 mL concentrate for 1000 mL buffer colorless white cap	2 x 100 mL concentrate for each 1000 mL buffer colorless white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 mL ready-to-use solution colored red black cap	2 x 55 mL ready-to-use solution colored red black cap	4 x 55 mL ready-to-use solution colored red black cap
4	CONJ HRP IgM	Conjugate anti-Human IgM-HRP conjugate (sheep)	8.0 mL ready-to-use solution colored green green cap	8.0 mL ready-to-use solution colored green green cap	2 x 8.0 mL ready-to-use solution colored green green cap
5	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap	8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap	2 x 8.0 mL ready-to-use solution colorless blue cap
6	COVER	Covering film	2 pieces	2 pieces	4 pieces
7	SWAB	Swab 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3 x 2 pieces	6 x 2 pieces	12 x 2 pieces
8		Certificate of Analysis	1 piece	1 piece	1 piece
9		Instructions for Use	1 piece	1 piece	1 piece

Antigens Used

Name	Description	Specificity
Tpp15	<i>Treponema pallidum</i> protein 15	Antigens listed are highly specific for all stages of infection.
Tpp17	<i>Treponema pallidum</i> protein 17	
Tpp47	<i>Treponema pallidum</i> protein 47	
TmpA	<i>Treponema</i> membrane protein A	

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micro-pipettes • adjustable 8-channel micro-pipette or multi-pipette • reagent container for multi-channel micro-pipettes • measuring cylinder • test tubes for sample dilution • test tube rack • washer for 96-well microtiter plates • laboratory system: Seramun SpotSight® plate mono / strip scanner with evaluation software Seramun SpotSight® scan • deionized water • lint-free absorbent paper • stop watch • collecting devices for infectious material • opaque cover (substrate reaction)

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. The kit may be performed by laboratory professional user only.

Follow the instructions carefully. The shelf life specified must be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Do not use reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for sample diluent, wash buffer and substrate.

All serious incidents occurring in relation with SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all components to room temperature before use.

For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multichannel pipette is recommended to avoid time delays.

Avoid time delays during dispensing of reagents.

Substrate must be protected from direct light!

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of wells and incorrect timing may lead to erroneous results.

Air bubbles generated by forceful pipetting of samples and/or reagents may cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be evaluated.

Damaged arrays, e.g. by **scratching** the bottom of the well with pipet tips or washer needles, are not suitable for evaluation.

Before taking images of the wells make sure to remove particles or fibers which may adhere to the bottom side of the wells using the swab provided in the kit.

Images of dried spots may appear more intense, which can lead to slight deviations of the measured values when scanned repeatedly. Assessment of the individual parameters is not changed.

Workplace Requirements

Processing spot immunoassays requires a clean workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells must be avoided. Fibers may cause interferences when taking images of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Some reagents may contain biocides as preservative. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious.

Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

WELLS	-	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208 EUH210	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request
DIL	EUH208 EUH210 -	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Safety data sheet available on request. Contains material of animal origin.
CONJ HRP IgM	Hazard components EUH208 H360D P202 P280 P308+P313 P501 -	N-methyl-2-pyrrolidone; 1-methyl-2-pyrrolidone Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. Restricted to professional users. May damage the unborn child Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection. IF exposed or concerned: Get medical advice / attention. Dispose of contents / container in accordance with local regulations. Contains material of animal origin.
SWAB	Hazard components H225 H319 H336 P210 P280 P304+P340 P305+P351+P338	Propan-2-ol; isopropyl alcohol; isopropanol Highly flammable liquid and vapour. Causes serious eye irritation. May cause drowsiness or dizziness. Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking. Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection. IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing

Limitations of the Procedure

Result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. In an early stage of infection antibodies may not be present yet or below detection limit.

Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

In rare cases, specimens may contain antibodies to BSA (bovine serum albumin) and / or AGE (advanced glycation end products), which may cause nonspecific reactions, so that the test result is read as "not available" ("n.a.") by the Seramun SpotSight® scan software.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect serum or plasma (citrate, EDTA, heparin) of human origin in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 7 days. For longer periods samples have to be stored at < -15 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Sample Preparation

Bring samples to room temperature before use. Homogeneity should be ensured by shaking components briefly.

Samples have to be diluted 1 : 101 (v/v) with sample diluent.

Example: 10 µL sample and 1000 µL sample diluent.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtitration strips is stable until the printed expiration date when stored at 2...8 °C. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

Reagent Preparation

Allow all components to reach **room temperature** prior to use. The **microtiter plate** is vacuum sealed with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored at 2...8 °C and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Dilute **wash buffer (10x)** 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water. The prepared wash buffer must be thoroughly mixed before use.

The **substrate** must be protected from direct light. The test should not be performed with a substrate solution that is colored dark or contains colored precipitates.

Assay Procedure

Performance at room temperature (RT, 18...25 °C). Bring **all** ready-to-use test reagents, prepared wash buffer and microplate to **room temperature**. Mix all reagents before use by gently shaking, avoid foaming.

The aspiration and washing steps can be carried out manually or with the aid of a microtiter plate washer.

Important Notes on Test Procedure:

Avoid mechanical contact (**scratching**) on the bottom of the wells with pipette tips or washer needles. This will irreparably damage the array!

All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted **without** causing **air bubbles** into the wells!

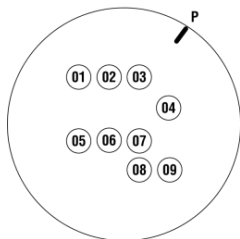
1. Provide the required number of wells **WELLS** according to the number of samples.
2. Preparation of working dilution of the sample: 1 : 101 dilution
e.g. 10 µL sample to 1000 µL sample diluent **DIL**
3. Pipette **100 µL** diluted sample per well.
4. Cover plate with covering film **COVER** and incubate for **30 min** at RT.
5. Remove liquid, then wash wells **3x** using **400 µL** diluted wash buffer per well,
Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
6. **Add 50 µL** of the conjugate **CONJ HRP IgM** (anti-Human IgM-HRP) to each well.
7. Cover plate with covering film **COVER** and incubate for **30 min** at RT.
8. Remove liquid, then wash wells **3x** using **400 µL** diluted wash buffer per well,
Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
9. **Add 50 µL** of the substrate **SUBSTR** to each well.
10. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at RT.
11. Remove liquid. Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
12. Clean bottom of wells with swab **SWAB** shortly before scanning the images.
13. **Take images** using the Seramun SpotSight® plate mono / strip und evaluate the results with the Seramun SpotSight® scan software.

If image acquisition is performed with the scanner Seramun SpotSight® strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

After aspiration of the substrate the color of developed spots is stable for 24 h when the plate is stored protected from light.

Evaluation of Results

Arraylayout



Antigens

- 04 TmpA
- 05 Tpp15
- 06 Tpp17
- 07 Tpp47

Controls

- 01 Positive control (PC)
- 02 Cut-off control (CO)
- 03 Negative control (NC)
- 08 IgM conjugate control (MC)
- 09 Serum control (SC)

P Well position marker

Qualitative evaluation

Validity Criteria for the Test

SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intense spot, stained darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than cut-off control
4. Serum control (SC). Intense spot, always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.
5. IgM conjugate control (MC). Intense spot. Serving as antibody isotype control.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1. to 5. is not met.

If the above-mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the validity criteria contact the manufacturer.

Interpretation of Results

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun SpotSight® plate mono / strip and in combination with the Seramun SeraSpot® scan software.

The results are interpreted as follows:

Evaluation	Conditions
Positive	Color intensity of at least two antigen spots > cut-off control
Borderline	Color intensity of one antigen spot > cut-off control
Negative	Color intensity of the antigen spots ≤ cut-off control

Performance Characteristics

Precision

Samples with known antibody reactivity were examined in the SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM and the color intensities of spots (RAW) were determined. These values were then used to determine the coefficients of variation (CV) as a measure of the precision within a test run (intra-assay CV), between different test runs (inter-assay CV) and between different test lots (lot-to-lot CV).

Antigen	Intra-assay coefficient of variation		Inter-assay coefficient of variation		Lot-to-lot coefficient of variation	
	\bar{x} RAW n=8	CV [%]	\bar{x} RAW n=48	CV [%]	\bar{x} RAW n=144	CV [%]
TmpA	69.5	10.9	59.7	12.1	66.1	11.5
Tpp15	72.0	9.8	48.2	10.7	79.8	13.3
Tpp17	111.7	8.2	76.6	8.5	116.8	10.3
Tpp47	50.9	9.1	74.4	12.5	56.0	16.6
Procedure	1 operator 8 determinations 1 batch		1 operator 8 determinations 2 testings per day 3 days 1 batch		1 operator 8 determinations 2 testings per day 3 days 3 batches	

Determination of the Cut-off Value

The cut-off range is determined specifically for each test.

Interfering Substances

All tested substances do not have a significant impact on the test results even if present in elevated concentrations in the serum: 20 mg/dL bilirubin C and F each (simulation of icteric samples), 500 mg/dL hemoglobin (simulation of hemolytic samples), 1000 mg/dL lipids (triglycerides) (simulation of lipemic samples) and 500 IU/mL rheumatoid factor.

Cross Reactivity

Serum samples from pregnant women (n=51) were analyzed by SeraSpot® Anti-Treponema-4. 2 samples were tested positive (initial specificity 96.1 %). 1 sample was confirmed positive by a second reference test (amended specificity 98.0 %).

Sensitivity

Pre-characterized samples (n=203) were analyzed to determine the sensitivity in comparison to reference tests in IgM detection of SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM. Samples with discrepant results were retested in a second reference test.

IgM		Reference test	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	90	7
	negative	4	102
Samples total		94	109

Sensitivity*: 95.7 %

*Borderline samples were considered positive.

Specificity

Blood donor samples (n=382) were examined for the specificity in comparison to reference tests in IgM detection of SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM. Samples with discrepant results were retested in a second reference test.

IgM		Referenztest	
		positive	negative
SeraSpot®	positive	3	5
	negative	0	374
Samples total		3	379

Specificity*: 98.7 %

*Borderline samples were considered positive.

Application

Automated Workflow

Manually diluted positive samples were assayed side by side in SeraSpot® Anti-Treponema-4 IgM, by hand and by use of an automatic microplate processor. Data were generated with the device DS2® (Dyex Technologies). The correlation was calculated with $R^2 > 0.9$ for all antigens (Tpp15, Tpp17, Tpp47 and TmpA). Assay procedure using an automatic microplate processor such as DS2® is possible.

Change History

Version	Section	Modifications
2022-10_v02_DE_EN	Entire document	Updating of the intended use Conversion of the subsections Insertion of the safety instructions Removal of pipetting scheme
	Entire document	Updating of wording and correction of spelling mistakes

References

1. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) online (Hrsg.): Diagnostik und Therapie der Syphilis. Leitlinien der Deutschen STD Gesellschaft. 07/2008
2. Brandis H.; Eggers H.J.; Köhler W.; Pulverer G. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York; 7. Auflage 1994
3. Bundesministerium für Gesundheit (Hrsg.): Treponema pallidum. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2002; 45: 818-826
4. Hagedorn H.-J.; Brockmeyer N.H.; Hunfeld K.P.; Münstermann, D.; Potthoff A.; Schöfer H.: Syphilis. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) 16; Urban und Fischer, München; 2. Auflage 2012
5. Larsen S.A.; Steiner B.M.; Rudolph A.H.: Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1995; Vol. 8, No. 1; p1-21
6. Neumeister B.; Geiss H.K.; Braun R.W.; Kimmig P. (Hrsg): Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; 2. Vollständig überarbeitete Auflage 2009
7. Sambri V.; Marangoni A.; Eyer C.; Reichhuber C.; Soutschek E.; Negosanti M.; D'Antuono A.; Cevenini R.: Western Immunoblotting with Five Treponema pallidum Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, May 2001; Vol. 8, No. 3; p.534-539
8. Thomas L. (Hrsg): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 5. Auflage 1998

