



**MICROSYPH™ TPHA1000**

**IVD**

**REF** **FTPHA1000**

**1000**

**For professional use only  
Usage reserve aux professionnels  
Sólo para uso profesional  
Nur für den Fachgebrauch  
Solo per uso professionale**



**Axis-Shield Diagnostics Limited  
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.  
Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.  
E-mail: [shield@uk.axis-shield.com](mailto:shield@uk.axis-shield.com)  
Web: [www.axis-shield.com](http://www.axis-shield.com)**

## ENGLISH:

## INTENDED USE

MICROSYPH™ TPHA1000 is a rapid assay for the detection of specific antibodies to *Treponema pallidum* in human serum or plasma (either di-potassium EDTA, sodium citrate or lithium heparin) by indirect haemagglutination. The kit is intended to be used as an initial screening test.

## INTRODUCTION

Syphilis is a venereal disease caused by the spirochaete microorganism *Treponema pallidum*. As this organism cannot be cultured *in vitro* the diagnosis of syphilis depends on the correlation of clinical data with the specific antibody demonstrated by serological tests. Serological screening tests for syphilis utilising cardiolipin and lecithin as antigens are simple to perform but biological false positive (BFP) reactions occur frequently because these tests use non-treponemal antigens<sup>1</sup>. The TPI and FTA-ABS tests utilise pathogenic *T. pallidum* as the antigen but these tests present some difficulties for routine serodiagnosis. The TPI test requires living pathogenic *T. pallidum* and the FTA-ABS test requires a fluorescence microscope. Both tests require a high level of expertise.

TPHA assays have been shown to be a convenient and specific test for the diagnosis of treponemal infection, having a specificity similar to that of the TPI test<sup>6</sup> and a sensitivity comparable to that of the FTA-ABS test<sup>7</sup>. It requires minimal laboratory equipment and is very simple to perform. It can be used in conjunction with automated liquid handling systems for improved throughput in the busy laboratory.



## PRINCIPLE OF THE ASSAY

The MICROSYPH™ TPHA1000 test detects human (serum/plasma) antibodies to *T. pallidum* by means of an indirect haemagglutination (IHA) method. Preserved avian erythrocytes are coated with antigenic components of pathogenic *T. pallidum* (Nichol's strain)<sup>2,3,4,5</sup>. These Test Cells agglutinate in the presence of specific antibodies to *T. pallidum*, and show characteristic patterns in microwell plates.

Antibodies to non-pathogenic treponemes are absorbed by an extract of Reiter's treponemes included in the cell suspension. Test results are obtained in 60 minutes and the cell agglutination patterns are easily read and stable.

To facilitate the necessary dilution step a blue dye has been added to the Diluent. This changes colour when the sample is added.

## KIT COMPONENTS

Test Cells	2 × 40ml	Preserved avian erythrocytes coated with sonicated <i>T. pallidum</i> antigen in buffer. <input type="checkbox"/> <b>The Test Cells must be thoroughly re-suspended before use.</b> <input type="checkbox"/> <b>The Test Cells settle out when stored.</b> <input type="checkbox"/> <b>It is important that settled cells are covered with the buffer during storage at 2-8°C.</b>	
Diluent	1 × 250ml	Buffer containing blue dye. Contains 0.1% sodium azide as preservative. <input type="checkbox"/> <b>Ready-to-use.</b>	
Reactive (Positive) Control Serum <b>CONTROL +</b>	1 × 0.5ml	Human serum containing antibodies to <i>T. pallidum</i> . The human serum used is non-reactive for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies when tested by FDA-cleared assays. <input type="checkbox"/> <b>Dilute before use.</b>	
Non-Reactive (Negative) Control Serum <b>CONTROL -</b>	1 × 0.5ml	The human serum used is non-reactive for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies when tested by FDA-cleared assays. Contains 0.1% sodium azide as preservative. <input type="checkbox"/> <b>Dilute before use.</b>	

## STORAGE OF REAGENTS

---

The reagents in each kit have been matched to produce the appropriate reaction and reagents must not be interchanged with those from other batches.

The kit should be stored **upright** at 2-8°C at all times. Do not use reagents beyond their expiry date. Reagents should be discarded if they become contaminated or do not demonstrate correct activity with the Reactive or Non-Reactive Controls.

A kit was opened and reused in five occasions over a 52 week period with no adverse effect on performance.

## SAMPLE AND STORAGE

---

Serum or plasma samples may be used. Store at 2-8°C if a preservative such as 0.1% azide is added prior to storage. For long term storage, samples should be stored at -20°C. Any visible particulate matter should be removed by centrifugation prior to assay.

## SAMPLE DILUTION

---

Samples, Reactive Control and non-Reactive Control must be diluted 1 in 20 in Diluent. The Diluent contains a blue dye that visibly changes colour from blue to pale green/yellow when the specimen is added.

For spectrophotometric confirmation of sample addition, dilute the samples according to steps 1-2 of the Assay Protocol. Before proceeding to step 3, read the microwell plate in a plate reader at 450nm using 690nm as the reference wavelength if available. If the optical density (O.D.) is less than 0.2 insufficient sample volume should be suspected and a fresh dilution prepared.

Please note that the Reactive and Non-Reactive Controls may give O.D. readings of less than 0.2 due to their composition so extra care must be taken to ensure the Control is added.

Dilutions should be used only on the day of preparation.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

---

### **For *in vitro* diagnostic use only.**

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. Strictly avoid contaminating any of the reagents or sample dilutions with saliva as this will cause confusing patterns similar to a positive result with samples that should be negative.
3. Controls contain human serum tested by FDA-cleared assays for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4th edition, 1999, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
4. Do not pipette by mouth.
5. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
6. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
7. The Diluent and Non-Reactive Control contain 0.1% sodium azide which is classified as per applicable European Economic Community Directives as harmful (Xn). The following are the appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases.

R22	Harmful if swallowed
S35	Dispose of this material in a safe way
S36/37/39	Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection

Although the concentration of azide present is low, to prevent the accumulation of explosive lead or copper salts, these materials should not be disposed of via sinks with metal traps or drain lines. All drains should be flushed through with water after use.

8. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Axis-Shield Diagnostics.

## PREPARATION

### *Materials/Equipment Required but not Provided*

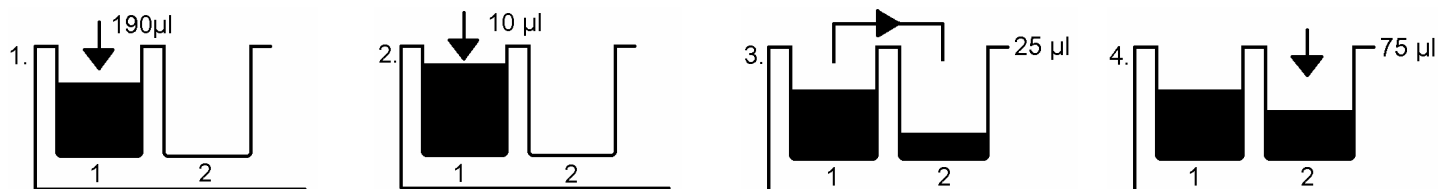
1. Accurate and properly maintained pipettes for delivering 10, 25, 75 and 190 microlitres.
2. Rigid microwell plates with "U"-shaped wells.
3. Microwell plate reader system and/or automated processors (optional). All instruments and interpretation software must be validated before use and operated, maintained and calibrated in accordance with the manufacturers' instructions.

### *Materials Provided*

FTPHA1000 contains sufficient reagents to perform 1000 tests manually. The number of tests obtained using automated systems will depend on the characteristics of the system.

## ASSAY PROTOCOL

1. Each test requires 2 wells of a microwell plate. Wipe the microwell plate with a clean damp cloth or tissue to remove any static charge. Add 190 $\mu$ l of Diluent to Well 1.
2. Add 10 $\mu$ l of Sample to Well 1. Using a pipette mix the contents of Well 1. Note: Two further sets of wells are required for the Reactive and Non-Reactive Controls. The Controls should be treated exactly the same as the samples.
3. Transfer 25 $\mu$ l to Well 2.
4. Add 75 $\mu$ l of fully re-suspended Test Cells to the wells containing 25 $\mu$ l of diluted sample or Control.



5. Mix the contents of the plate by tapping all four sides of the plate.
6. Incubate at room temperature for a minimum of 60 minutes.  
**Caution: Keep the plate away from heat, direct sunlight and any source of vibration.**
7. Read results. If using a reader, read the plate visually first as the reader may agitate the plate when it is ejected from the instrument.

## READING THE RESULTS

### *Visually*

#### **Positive Result**

A strong positive will appear as a smooth mat of cells on the bottom of the well, sometimes with folded edges. With less strongly reacting samples, this mat will be smaller and may be surrounded by a ring of cells.

#### **Negative Result**

A negative result is indicated by a compact button of cells with or without a very small hole in the centre.

## Indeterminate Result

An indeterminate result is seen as a button of cells having a small hole in the centre giving the appearance of a well defined dense ring with a fairly clear background around this ring.

## Collapsed result

Some very strongly positive samples may give collapsed patterns when tested at a 1/80 dilution. These patterns are similar to an indeterminate result but the dense ring may have a ragged appearance.

### *Spectrophotometrically*

Results obtained spectrophotometrically must also be checked manually.

## QUALITY CONTROL

---

The Non-Reactive Control should not cause agglutination, whilst the Reactive Control should cause agglutination in the test. If this is not the case, this renders the assay invalid and patient sample results should not be reported. If repeating the test, prepare a fresh dilution of each sample and each Control.

## INTERPRETATION OF RESULTS

---

Any sample giving a positive result in the test should be considered reactive in the test. Unless local procedures state otherwise, such samples should be re-tested in duplicate using the original sample. Samples that are reactive in at least one of the duplicate tests are considered repeatedly reactive in the MICROSYPH™ TPHA1000 assay. Such samples should be further investigated and the results from the assay considered with any other clinical and/or assay information.

A negative result indicates the absence of antibodies to *T. pallidum*. In some very early cases of syphilis a negative result may be obtained (see **Limitations of Procedure**).

An indeterminate result may indicate a low level of antibody in early syphilis, an old treated syphilis or yaws. In such cases the sample should be re-tested. If this is not possible a fresh sample should be collected as soon as possible and the test repeated, with the patient's clinical condition being taken into consideration.

## LIMITATIONS OF USE

---

1. The MICROSYPH™ TPHA1000 kit does not contain Control Cells. A positive result may therefore be due to a non-specific reaction of the sample with the cells. In order to exclude this possibility any sample reactive in the test should be re-tested using the MICROSYPH™ TPHA200 kit (FTPHA200).  
For confirmation of a positive result the FTA-ABS test should be used, since it allows a differentiation between IgG and early IgM antibodies. The FTA-ABS test is also useful in very early syphilis where the haemagglutination test may be negative.  
For therapeutic control it is advisable to use a quantitative test such as an RPR test. This reagent is available from Axis-Shield Diagnostics Ltd.
2. Although the MICROSYPH™ TPHA1000 test is highly specific, false positive results have been known to occur in patients suffering from leprosy, infectious mononucleosis and connective tissue disorders.
3. Serological tests, including MICROSYPH™ TPHA1000, cannot distinguish between syphilis and other forms of pathogenic treponemal infections<sup>8</sup>, e.g. yaws<sup>7</sup>. Clinical evidence should be used to determine which condition is present.
4. Syphilis antibodies detected in the MICROSYPH™ TPHA1000 test persist after successful treatment. Therefore, a positive test may indicate past or present infection<sup>6,7,9,10</sup>.
5. Following infection with *T. pallidum*, antibodies (both anti-lipoidal and anti-treponemal) may not appear until 1 to 4 weeks after the characteristic syphilis lesion (chancre) has formed. Thus, in early primary syphilis, tests such as MICROSYPH™ TPHA1000 may give a negative result for some samples<sup>11,12,13</sup>. In these cases, alternative testing procedures e.g. microscopic identification of *T. pallidum* should be used.

6. Results obtained using plate reading systems must be checked manually. Depending on the reading parameters some indeterminate or collapsed patterns may be misread as borderline or negative.
7. This test is to be used only with individual (unpooled) serum or plasma samples.
8. Use of haemolysed samples, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.

## P E R F O R M A N C E   C H A R A C T E R I S T I C S

---

### *Specificity*

1000 donor samples (500 serum and 500 plasma) were assayed in-house with one lot of reagents and a further 1000 donor samples (500 serum and 500 plasma) were assayed with a second lot of reagents, the results are presented below.

No. of Samples	Reagent Lot	No. Samples Positive or indeterminate		Specificity
		Initial	Repeat	
500 Serum	1	0	0	100%
500 Plasma	1	2	0	100%
500 Serum	2	0	0	100%
500 Plasma	2	0	0	100%

### *Specificity with potentially cross-reactive samples*

71 potentially cross-reactive samples were assayed in-house with one lot of reagents and a further 72 samples assayed in-house with a second lot of reagent, the results are presented below.

No. of Samples	Reagent lot	No. Samples Positive or indeterminate	Specificity
71 <small>(see note 1)</small>	1	0	100%
72 <small>(see note 2)</small>	2	0	100%

Note 1 : 18 Rheumatoid Factor positive, 9 Lyme Disease positive, 5 Anti-Cardiolipin positive, 16 antenatal, 12 HCV positive, 6 HIV positive and 5 HBV positives samples

Note 2 : 18 Rheumatoid Factor positive, 9 Lyme Disease positive, 5 Anti-Cardiolipin positive, 16 antenatal, 12 HCV positive, 6 HIV positive and 6 HBV positives samples

### *Sensitivity*

137 samples found to be positive in using ELISA assays were assayed in-house with two reagent lots, the results are presented below.

No. of Samples	Reagent Lot	No. Samples Negative	Sensitivity
137	1	3	97.8%
137	2	2	98.5%

## S T A N D A R D I S A T I O N

---

The MICROSYPH™ TPHA1000 test has been shown to give a 50% agglutination reaction with the WHO 3-1980 reference preparation at a titre of between 1/2560 to 1/10240 using three reagent lots and five operators.

## FRANCAIS : UTILISATION

---

Le test MICROSYPH™ TPHA1000 est un essai rapide pour la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre *Treponema pallidum* dans les échantillons de sérum ou de plasma humain (EDTA dipotassium, citrate de sodium ou héparine lithium) par hémagglutination indirecte. Cette trousse est conçue comme un test de dépistage initial.

## INTRODUCTION

---

La syphilis est une maladie vénérienne provoquée par le spirochète *Treponema pallidum*. Puisque cet organisme ne peut pas être cultivé *in vitro*, le diagnostic de la syphilis repose sur l'association des données cliniques et de la détection des anticorps spécifiques grâce aux tests sérologiques. Il est aisé de réaliser des tests de dépistage sérologiques pour la syphilis en utilisant la cardioline et la lécithine comme antigènes, mais il se produit fréquemment des réactions biologiques faussement positives parce que ces tests utilisent des antigènes non tréponémiques<sup>1</sup>. Les tests TPI et FTA-ABS utilisent des *T. pallidum* pathogènes comme antigène, mais ces tests présentent des difficultés pour un sérodiagnostic de routine. Le test TPI exige des *T. pallidum* pathogènes vivants et le test FTA-ABS requiert un microscope à fluorescence. Les deux tests demandent un niveau de compétence considérable.

Les essais TPHA se sont révélés avantageux et spécifiques pour le diagnostic de l'infection par Tréponème, puisqu'ils possèdent une spécificité semblable au test TPI<sup>6</sup> et une sensibilité comparable à celle du test FTA-ABS<sup>7</sup>. L'équipement de laboratoire nécessaire est minimal et le test est très simple à exécuter. Il peut être utilisé conjointement avec des systèmes de manipulation automatique des liquides pour augmenter la capacité productive des laboratoires.

## PRINCIPE DU DOSAGE



---

Le test MICROSYPH™ TPHA1000 détecte les anticorps humains (sérum/plasma) dirigés contre *T. pallidum* au moyen d'une méthode d'hémagglutination indirecte (IHA). Des hématies aviaires sont revêtues de composants antigéniques de *T. pallidum* pathogènes (souche Nichols)<sup>2,3,4,5</sup>. En présence d'anticorps spécifiques dirigés contre *T. pallidum*, ces Cellules Tests s'agglutinent et forment des schémas caractéristiques dans les microplaques de puits.

Les anticorps dirigés contre les tréponèmes non pathogènes sont absorbés par un extrait de tréponèmes de Reiter compris dans les cellules en suspension. Les résultats du test s'obtiennent en 60 minutes et les schémas d'agglutination des cellules sont stables et facilement lisibles.

Pour faciliter l'étape de dilution, un colorant bleu a été ajouté au Diluant. Celui-ci change de couleur quand on ajoute l'échantillon.

## MATERIEL FOURNI

Cellules Test	2 × 40ml	Hématies aviaires revêtus d'antigène de <i>T. pallidum</i> soumis à sonication dans une solution tampon. <input type="checkbox"/> <b>Les Cellules de Test doivent être soigneusement remises en suspension avant usage.</b> <input type="checkbox"/> <b>Lors du stockage, les Cellules de Test se déposent.</b> <input type="checkbox"/> <b>Les cellules déposées doivent être recouvertes avec le tampon pendant le stockage à 2-8°C.</b>	
Diluant	1 × 250ml	Tampon contenant un colorant bleu et de l'azide de sodium à 0.1% comme conservateur. <input type="checkbox"/> <b>Prêt à l'emploi.</b>	Xn 
Sérum Témoin réactif (Positif)  <b>CONTROL +</b>	1 × 0.5ml	Sérum humain contenant des anticorps dirigés contre <i>T. pallidum</i> . Le sérum humain employé a été testé avec des essais approuvés par la FDA et a été trouvé négatif en antigène Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en antigènes et anticorps anti-VIH.  <input type="checkbox"/> <b>A diluer avant usage.</b>	
Sérum Témoin non réactif (Négatif)  <b>CONTROL -</b>	1 × 0.5ml	Le sérum humain employé a été testé avec des essais approuvés par la FDA et a été trouvé négatif en antigène Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en antigènes et anticorps anti-VIH. Contient de l'azide de sodium à 0.1% comme conservateur.  <input type="checkbox"/> <b>A diluer avant usage.</b>	Xn 

## CONSERVATION DES REACTIFS

Les réactifs de chaque trousse ont été associés pour produire la réaction appropriée ; les réactifs ne doivent pas être interchangeés avec d'autres provenant d'autres lots.

La trousse doit être stockée **droite** à 2-8°C en toutes circonstances. Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. Si les réactifs sont contaminés ou si leur activité n'est pas correcte avec les Témoins positif ou négatif, procéder à leur élimination.

Une trousse a été ouverte et réutilisée à cinq reprises sur une période de 52 semaines, sans effet négatif sur ses prestations.

## PRELEVEMENT ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Le dosage peut être effectué sur du sérum ou du plasma humains. Conserver à 2-8°C si un conservateur est ajouté avant le stockage comme de l'azide de sodium à 0.1%. Pour un stockage à long terme, les échantillons doivent être congelés à -20°C. Les échantillons troubles doivent être clarifiés par centrifugation avant le test

## DILUTION DES ECHANTILLONS

Les échantillons et les Témoins positif et négatif doivent être dilués au 1 / 20 avec le Diluant. Le Diluant contient un colorant bleu qui passe visiblement du bleu au vert pâle/jaune lorsque l'échantillon est ajouté.

Pour avoir une confirmation spectrophotométrique de l'ajout de l'échantillon, diluer les échantillons suivant les étapes 1-2 du Protocole de dosage. Avant de passer à l'étape 3, lire la microplaque de puits avec un lecteur à 450 nm en utilisant la longueur d'onde de 690 nm comme référence si elle est disponible. Si la densité optique (D.O.) est inférieure à 0.2, cela laisse entendre que le volume d'échantillon est insuffisant et il faudra préparer une nouvelle dilution.

Attention : du fait de leur composition, les Témoins positif et négatif peuvent donner des D.O. inférieures à 0.2. Veiller donc particulièrement à ce que le Témoin soit effectivement ajouté.

Les dilutions doivent être employées exclusivement le jour de leur préparation.

# AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

---

## **Pour usage diagnostic *in vitro* exclusivement.**

1. Respecter strictement les instructions fournies ici, particulièrement en ce qui concerne les conditions de manipulation et de stockage.
2. Eviter rigoureusement toute contamination des réactifs ou des échantillons par la salive, car cela risque de donner des schémas pouvant évoquer un résultat positif pour des échantillons qui devraient être négatifs.
3. Les Témoins contiennent du sérum humain testé avec des essais approuvés par la FDA pour l'antigène de surface de l'hépatite B, le VHC, l'antigène du VIH et les anticorps du VIH et trouvé non réactif/ négatif. Cependant comme aucune méthode connue ne peut garantir l'absence totale d'agents pathogènes, les Témoins doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec toutes les précautions dues pour tout matériau biologique potentiellement dangereux. Le Manuel de Santé CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4<sup>ème</sup> édition, 1999, décrit la manière de manipuler ces matériaux conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire. Ceci est valable pour les Etats-Unis.
4. Ne pas pipeter avec la bouche.
5. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les locaux où les trousse et échantillons sont manipulés.
6. Toute affection cutanée, coupure, abrasion et autre lésion de la peau doit être correctement protégée.
7. Le Diluant et le Témoin négatif contiennent de l'azide de sodium à 0.1%, classé comme nocif (Xn) par les Directives de l'Union Européenne. Voici les phrases de Risque (R) et de Sécurité (S) appropriées.

R22 Nocif en cas d'ingestion

S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage

S36/37/39 Porter un vêtement de protection, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

Bien que la concentration d'azide soit faible, ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou en cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau.

8. Les fiches de sécurité pour tous les composants dangereux contenus dans cette trousse sont disponibles sur demande auprès de Axis-Shield Diagnostics.

## **P R E P A R A T I O N**

---

### ***Matériel/Equipement nécessaire mais non fourni***

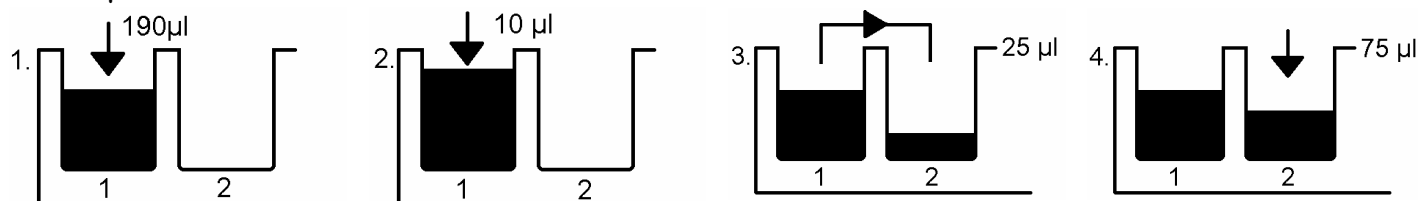
1. Pipettes de précision en parfait état pour dispenser 10, 25, 75 et 190 microlitres.
2. Microplaques de puits rigides avec puits en "U".
3. Système de lecture de microplaque et/ou processeur automatique (option). Tous les instruments ainsi que le logiciel d'interprétation doivent être validés avant usage et utilisés, entretenus et calibrés dans le respect des instructions fournies par le constructeur.

### ***Matériel fourni***

Les réactifs fournis avec la trousse FTPHA1000 suffisent à réaliser manuellement 1 000 tests. Le nombre de tests réalisables avec les systèmes automatiques dépend des caractéristiques du système employé.

## PROTOCOLE DU DOSAGE

1. Prélever 2 puits d'une microplaque pour chaque test. Essuyer la microplaque de puits avec un tissu propre et humide pour enlever toute charge statique. Ajouter 190 $\mu$ l de Diluant dans le Puits 1.
2. Ajouter 10 $\mu$ l d'échantillon dans le Puits 1. Utiliser une pipette pour mélanger le contenu du Puits 1. Note : Deux groupes de puits supplémentaires sont nécessaires pour les Témoins positif et négatif. Les Témoins doivent être traités exactement de la même manière que les échantillons.
3. Transférer 25 $\mu$ l dans le Puits 2.
4. Ajouter 75 $\mu$ l de Cellules Test parfaitement remises en suspension dans les puits contenant 25 $\mu$ l d'échantillon dilué ou de Témoin.



5. Mélanger le contenu de la plaque en fermant les quatre côtés de celle-ci.
6. Incuber à température ambiante pendant au moins 60 minutes.

**Attention : Conserver la plaque à l'abri de la chaleur, des rayons du soleil et de toute source de vibration.**

7. Lire les résultats. Si on utilise un lecteur, lire d'abord la plaque visuellement car le lecteur peut agiter la microplaque au moment où elle est éjectée de l'instrument.

## LECTURE DES RESULTATS

### *Visuellement*

#### **Résultat positif**

Un positif fort apparaîtra comme un amoncellement de cellules sur le fond du puits, parfois avec des rebords. Pour les échantillons réagissant moins fortement, l'amoncellement sera plus petit et peut-être entouré d'une bague de cellules.

#### **Résultat négatif**

Un résultat négatif se révèle par un bouton de cellules compact, avec ou sans un tout petit trou au centre.

#### **Résultat indéterminé**

Un résultat indéterminé se traduit par un bouton de cellules avec un petit trou au centre, ayant l'apparence d'une bague dense bien définie avec un fond très clair autour d'elle.

#### **Résultat « replié »**

Certains échantillons très fortement positifs peuvent présenter des bords repliés quand on les teste à une dilution de 1/80. Ces schémas ressemblent à un résultat indéterminé mais dans ce cas la bague dense peut avoir une apparence irrégulière.

### *Avec le spectrophotomètre*

Les résultats obtenus avec un spectrophotomètre doivent être vérifiés manuellement.

## CONTROLE QUALITE

Le Témoin Négatif ne doit pas provoquer d'agglutination, alors que le Témoin Positif doit causer l'agglutination dans le test. Si ce n'est pas le cas, l'essai doit être considéré comme non valable et les résultats de l'échantillon du patient ne doivent pas être pris en compte. Lors de la répétition du test, préparer une nouvelle dilution de chaque échantillon et de chaque Témoin.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

---

Un échantillon qui donne un résultat positif dans le test doit être considéré comme étant réactif. Sauf procédures locales établissant des règles différentes, ces échantillons doivent être retestés en doublets en utilisant l'échantillon original. Les échantillons qui s'avèrent réactifs au moins une fois lors de ces tests en doublet doivent être considérés comme étant réactifs répétables pour le test MICROSYPH™ TPHA1000. Ces échantillons devraient ensuite être encore examinés et les résultats de l'essai pris en compte avec toutes les autres informations cliniques et/ou sérologiques.

Un résultat négatif indique l'absence d'anticorps dirigés contre *T. pallidum*. Un résultat négatif peut se présenter dans certains cas de syphilis extrêmement précoces (Cfr. **Limites du dosage**).

Un résultat indéterminé peut indiquer un faible niveau d'anticorps dans une syphilis précoce, une syphilis ancienne traitée ou un pian. Dans ces cas, l'échantillon doit être testé à nouveau. Si ce n'est pas possible, il faudra prélever un nouvel échantillon aussitôt que possible et refaire le test, en tenant compte de la condition clinique du patient.

## LIMITES DU DOSAGE

---

1. La trousse MICROSYPH™ TPHA1000 ne contient pas de Cellules de Contrôle. Un résultat positif pourrait donc être imputable à une réaction non spécifique de l'échantillon vis-à-vis des cellules. Dans le but d'exclure cette possibilité, tout échantillon réactif devrait être testé à nouveau en utilisant la trousse MICROSYPH™ TPHA200 (FTPHA200).

Le test FTA-ABS devrait être utilisé pour confirmer un résultat positif, puisqu'il permet de distinguer les anticorps IgG et les IgM précoces. Le test FTA-ABS est également utile aux stades les plus précoces de la syphilis, quand le test d'hémagglutination peut être négatif.

Pour le contrôle thérapeutique, il est conseillé d'employer un test quantitatif comme un RPR. Ce réactif est disponible auprès de Axis-Shield Diagnostics Ltd.

2. Malgré la haute spécificité du test MICROSYPH™ TPHA1000, des résultats faussement positifs se sont produits chez des patients souffrant de lèpre, de mononucléose infectieuse et de désordres des tissus connectifs.
3. Les tests sérologiques, y compris MICROSYPH™ TPHA1000, ne permettent pas de distinguer la syphilis d'autres formes d'infections par tréponèmes<sup>8</sup>, c'est à dire le pian<sup>7</sup>. La situation clinique doit être utilisée pour déterminer la pathologie en acte.
4. Les anticorps de la syphilis détectés avec le test MICROSYPH™ TPHA1000 persistent après un traitement efficace. Un test positif peut donc indiquer une infection présente ou passée<sup>6,7,9,10</sup>.
5. Suite à une infection à *T. pallidum*, les anticorps (aussi bien anti-lipoidal qu'anti-tréponémiques) peuvent ne pas apparaître jusqu'à 1 à 4 semaines après la formation de la lésion caractéristique de la syphilis (chancre). C'est pourquoi des tests comme MICROSYPH™ TPHA1000 peuvent donner un résultat négatif aux stades précoces de la maladie pour certains échantillons<sup>11,12,13</sup>. Dans ces cas, il convient d'utiliser d'autres procédures de dépistage, par exemple l'identification au microscope de *T. pallidum*.
6. Les résultats obtenus grâce à des systèmes de lecture de microplaques doivent être vérifiés manuellement. En fonction des paramètres de lecture, certains schémas indéterminés ou « repliés » peuvent être pris erronément pour des borderline ou des négatifs.
7. Ce test doit être employé exclusivement avec des échantillons de sérum ou de plasma individuels.
8. L'utilisation d'échantillons hémolysés, de sérum pas complètement coagulé, d'échantillons de plasma contenant de la fibrine ou d'échantillons avec une contamination microbienne peut donner des résultats erronés.

## CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

### Spécificité

1 000 échantillons de donateurs (500 sérum et 500 plasma) ont été testés en interne avec un lot de réactifs et 1 000 autres échantillons de donateurs (500 sérum et 500 plasma) ont été testés avec un second lot de réactifs. Les résultats sont présentés ci-dessous.

N. d'échantillons	Lot de réactifs	N. échantillons positifs ou indéterminés		Spécificité
		Initial	Répété	
500 Sérum	1	0	0	100%
500 Plasma	1	2	0	100%
500 Sérum	2	0	0	100%
500 Plasma	2	0	0	100%

### Spécificité avec des échantillons pouvant présenter des réactions croisées

71 échantillons pouvant présenter des réactions croisées ont été testés en interne avec un lot de réactifs et 72 autres échantillons ont été testés en interne avec un deuxième lot de réactifs. Les résultats sont présentés ci-dessous.

N. d'échantillons	Lot de réactifs	N. échantillons positifs ou indéterminés	Spécificité
71 (note 1)	1	0	100%
72 (note 2)	2	0	100%

Note 1 : 18 échantillons positifs pour le facteur rhumatoïde, 9 positifs pour la maladie de Lyme, 5 positifs Anti-Cardiolipine, 16 anténatal, 12 positifs VHC, 6 positifs VIH et 5 positifs VHB

Note 2 : 18 échantillons positifs pour le facteur rhumatoïde, 9 positifs pour la maladie de Lyme, 5 positifs Anti-Cardiolipine, 16 anténatal, 12 positifs VHC, 6 positifs VIH et 6 positifs VHB.

### Sensibilité

137 échantillons classés comme positifs en utilisant des tests ELISA ont été testés en interne avec deux lots de réactifs. Les résultats sont présentés ci-dessous.

N. d'échantillons	Lot de réactifs	N. échantillons négatifs	Sensibilité
137	1	3	97.8%
137	2	2	98.5%

## STANDARDISATION

Il a été démontré que le test MICROSYPH™ TPHA1000 donne une réaction d'agglutination à 50% avec la préparation de référence 3-1980 de l'OMS à un titrage compris entre 1/2560 et 1/10240 en utilisant trois lots de réactifs et cinq opérateurs.

MICROSYPH™ TPHA1000 es un ensayo rápido para la detección de anticuerpos específicos al *Treponema pallidum* en plasma o suero humano (tanto EDTA dipotásico, citrato de sodio como heparina de litio) mediante hemaglutinación indirecta. El kit está destinado a su utilización como prueba de despistaje inicial.

## **INTRODUCCIÓN**

---

La sífilis es una enfermedad venérea provocada por la espiroqueta *Treponema pallidum*. Ya que este organismo no puede cultivarse *in vitro*, el diagnóstico de sífilis depende de la correlación de los datos clínicos con los anticuerpos específicos mostrados por las pruebas serológicas. La realización de las pruebas serológicas de despistaje para la sífilis que utilizan cardioplipina y lecitina como antígenos es sencilla, pero es frecuente que se produzcan reacciones de falsos positivos biológicos (FPB) ya que estas pruebas utilizan antígenos no treponémicos<sup>1</sup>. Las pruebas TPI y FTA-ABS utilizan *T. pallidum* patógeno como antígeno, pero estas pruebas presentan ciertas dificultades para el serodiagnóstico rutinario. La prueba TPI requiere *T. pallidum* patógeno vivo y la prueba FTA-ABS requiere un microscopio de fluorescencia. Ambas pruebas requieren un gran nivel de experiencia.

Se ha demostrado que los ensayos TPHA son una prueba específica y conveniente para el diagnóstico de la infección por treponema y tienen una especificidad similar a la de la prueba TPI<sup>6</sup> y una sensibilidad comparable a la de la prueba FTA-ABS<sup>7</sup>. Requiere un equipo de laboratorio mínimo y su realización es muy sencilla. Puede usarse junto con sistemas de manipulación de líquidos automatizados que mejoran la productividad de los laboratorios.

## **PRINCIPIOS DEL ENSAYO**



---

La prueba MICROSYPH™ TPHA1000 detecta anticuerpos (suero/plasma) humanos contra *T. pallidum* por medio de un método de hemaglutinación indirecta (IAH). Los eritrocitos aviares conservados están recubiertos con componentes antigénicos de *T. pallidum* patógeno (cepa de Nichol)<sup>2,3,4,5</sup>. Estas Células de Prueba se aglutinan en presencia de anticuerpos específicos contra *T. pallidum* y muestran modelos característicos en placas de microvasos.

Los anticuerpos contra treponemas no patógenos son absorbidos por un extracto de treponemas de Reiter incluido en la suspensión celular. Los resultados de la prueba se obtienen en 60 minutos y los modelos de aglutinación celular son fácilmente legibles y estables.

Para facilitar la fase de dilución necesaria se ha añadido una tintura azul al Diluyente. Ésta cambia el color cuando se añade la muestra.

## COMPONENTES DEL KIT

Células de Prueba	2 × 40ml	Eritrocitos aviares conservados recubiertos con antígeno <i>T. pallidum</i> en el búfer. <input type="checkbox"/> <b>Las Células de Prueba deben volver a suspenderse por completo antes de su uso.</b> <input type="checkbox"/> <b>Las Células de Prueba se asientan cuando se guardan.</b> <input type="checkbox"/> <b>Es importante que las células asentadas se cubran con el búfer durante el almacenamiento a 2-8°C.</b>	
Diluyente	1 × 250ml	Búfer que contiene tintura azul. Contiene 0,1% de azida sódica como conservante. <input type="checkbox"/> <b>Listo para su uso.</b>	
Suero Control Reactivo (Positivo) <b>CONTROL +</b>	1 × 0,5ml	Suero humano que contiene anticuerpos contra <i>T. pallidum</i> . El suero humano utilizado es no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, el antígeno VIH y los anticuerpos VIH cuando se comprueba con ensayos autorizados por la FDA. <input type="checkbox"/> <b>Diluir antes de usar.</b>	
Suero Control No Reactivo (Negativo) <b>CONTROL -</b>	1 × 0,5ml	El suero humano es no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, el antígeno HIV y los anticuerpos HIV cuando se comprueba con ensayos autorizados por la FDA. Contiene 0,1% de azida sódica como conservante. <input type="checkbox"/> <b>Diluir antes de usar.</b>	

## ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Los reactivos de cada kit han sido clasificados para producir la reacción apropiada y no deben intercambiarse con los de otros lotes.

**El kit debe guardarse verticalmente a 2-8°C en todo momento.** No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad. Los reactivos deben descartarse si se contaminan o no muestran actividad con los Controles Reactivos y No Reactivos.

Un kit fue abierto y reutilizado en cinco ocasiones durante un período de 52 semanas sin consecuencias adversas para su rendimiento.

## OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Se pueden utilizar muestras de plasma o suero. Guardar a 2-8°C si se añade un conservante, por ejemplo, 0,1% de azida antes del almacenamiento. Para almacenamiento de larga duración, las muestras deben guardarse a -20°C. Hay que eliminar mediante centrifugación todas las partículas visibles antes del ensayo.

## DILUCIÓN DE LA MUESTRA

Las Muestras, los Controles Reactivos y los Controles No Reactivos deben diluirse 1 en 20 en Diluyente. El Diluyente contiene una tintura azul que cambia visiblemente el color de azul a amarillo/verde pálido cuando se añade la muestra.

Para la confirmación espectrofotométrica del añadido de la muestra, diluir las muestras de acuerdo con los pasos 1-2 del Protocolo del Ensayo. Antes de continuar con el paso 3, leer la placa de microvasos en un lector de placas a 450nm utilizando 690nm como longitud de onda de referencia si está disponible. Si la densidad óptica (O.D.) es inferior a 0,2, se debe sospechar un volumen insuficiente de la muestra y preparar una dilución nueva.

Observar que los Controles Reactivos y No Reactivos pueden proporcionar lecturas O.D. inferiores a 0,2 debido a su composición, de modo que se debe prestar una atención especial para garantizar que se añade el Control.

Las diluciones sólo deben usarse el día de la preparación.

# ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

---

## *Únicamente para diagnóstico in vitro.*

1. Seguir estrictamente las instrucciones de este prospecto, especialmente respecto a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Evitar estrictamente la contaminación con saliva de cualquiera de las diluciones de la muestra o reactivos, ya que esto provocará modelos confusos similares a un resultado positivo con muestras que deberían ser negativas.
3. Los controles contienen suero humano comprobado mediante ensayos autorizados por la FDA para el antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, el antígeno HIV y los anticuerpos HIV y que han demostrado ser no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece la garantía total de ausencia de agentes infecciosos, los Controles deben ser considerados como potencialmente infecciosos y manipulados con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. El Manual Sanitario CDC/NIH "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", 4ª edición, 1999, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
4. No pipetar con la boca.
5. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
6. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes, quemaduras y otras lesiones de la piel.
7. El Control No Reactivo y el Diluyente contienen 0,1% de azida sódica, que está clasificada según las Directivas de la Comunidad Económica Europea como nociva (Xn). Las siguientes son las frases correspondientes al Riesgo (R) y la Seguridad (S).

R22 Nocivo si se ingiere

S35 Desechar este material de forma segura

S36/37/39 Utilizar ropas de protección, guantes y protectores oculares/faciales adecuados

Aunque la concentración de azida presente es baja, para impedir la acumulación de sales de cobre o plomo explosivas, estos materiales no deben desecharse por fregaderos con tuberías o sifones metálicos. Todas las tuberías deben lavarse minuciosamente con agua después de su uso.

8. Pueden solicitarse a Axis-Shield Diagnostics las hojas técnicas de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.

## PREPARACIÓN

---

### *Materiales/Equipo Necesario No Incluido*

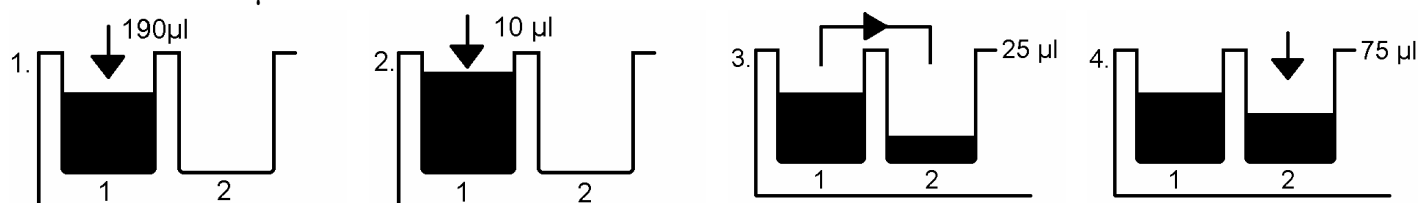
1. Pipetas de precisión y adecuadamente mantenidas para proporcionar 10, 25, 75 y 190 microlitros.
2. Placas de microvasos rígidas con vasos en forma de "U".
3. Sistema de lectura de placas de microvasos y/o procesadores automatizados (opcional). Todos los instrumentos y el software de interpretación deben validarse antes de ser utilizados y deben emplearse, mantenerse y calibrarse de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

### *Materiales Proporcionados*

FTPHA1000 contiene reactivos suficientes para llevar a cabo manualmente 1000 pruebas. El número de pruebas obtenido utilizando sistemas automatizados dependerá de las características del sistema.

## PROTOCOLO DEL ENSAYO

1. Cada prueba requiere 2 vasos de una placa de microvasos. Limpiar la placa de microvasos con un paño húmedo y limpio para eliminar cualquier carga estática. Añadir 190µl de Diluyente al Vaso 1.
2. Añadir 10µl de Muestra al Vaso 1. Utilizando una pipeta, mezclar el contenido del Vaso 1. Nota: Son necesarios otros dos juegos de vasos para los Controles Reactivo y No Reactivo. Los Controles deben tratarse exactamente del mismo modo que las muestras.
3. Transferir 25µl al Vaso 2.
4. Añadir 75µl de Células de Prueba nuevamente suspendidas totalmente a los vasos que contienen 25µl de Control o muestra diluida.



5. Mezclar el contenido de la placa dando ligeros golpecitos en los cuatro lados de la placa.
6. Incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 60 minutos.

**Precaución: Mantener la placa lejos de fuentes de calor, luz directa del sol y cualquier causa de vibración.**

7. Leer los resultados. Si se utiliza un lector, leer visualmente la placa en primer lugar, ya que el lector puede agitar la placa cuando es expulsada del instrumento.

## LECTURA DE LOS RESULTADOS

### *Visualmente*

#### **Resultado positivo**

Un fuerte positivo aparecerá como una esterilla lisa de células situada en la parte inferior del vaso, en ocasiones, con los bordes plegados. Con muestras que reaccionen con menos fuerza, esta esterilla será menor y puede estar rodeada por un anillo de células.

#### **Resultado Negativo**

Los resultados negativos aparecen indicados por un botón compacto de células, con o sin un orificio diminuto en el centro.

#### **Resultado Indeterminado**

Los resultados indeterminados se observan como un botón de células que tienen un orificio pequeño en el centro, lo que proporciona la apariencia de un anillo denso y bien definido con un fondo bastante claro alrededor de dicho anillo.

#### **Resultado Colapsado**

Algunas muestras muy fuertemente positivas pueden proporcionar modelos colapsados cuando se comprueban con una dilución 1/80. Estos modelos son similares a un resultado indeterminado, pero el anillo denso puede tener una apariencia desigual.

### ***Espectrofotométricamente***

Los resultados obtenidos espectrofotométricamente también deben ser verificados manualmente.

## CONTROL DE CALIDAD

---

El Control No Reactivo no debe provocar aglutinación, mientras que el Control Reactivo debe provocar aglutinación de la prueba. Si esto no es así, el ensayo no es válido y no se deben notificar los resultados de la muestra del paciente. Si se repite la prueba, preparar una dilución nueva de cada muestra y de cada Control.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

---

Todas las muestras que proporcionen un resultado positivo en la prueba deben considerarse reactivas en la prueba. A menos que los procedimientos locales indiquen algo distinto, hay volver a realizar otra prueba por duplicado utilizando la muestra original. Las muestras que son reactivas en, como mínimo, una de las pruebas duplicadas son consideradas repetidamente reactivas en el ensayo MICROSYPH™ TPHA1000. Hay que seguir estudiando estas muestras y considerar los resultados del ensayo junto con otros datos del ensayo y/o clínicos.

Un resultado negativo indica la ausencia de anticuerpos contra *T. pallidum*. En algunos casos muy tempranos de sífilis, se pueden obtener resultados negativos (ver **Limitaciones del Procedimiento**).

Un resultado indeterminado puede indicar un nivel bajo de anticuerpos en una sífilis temprana, en una sífilis antigua tratada o en una frambesia. En estos casos, hay que volver a comprobar la muestra. Si esto no es posible, se debe obtener una muestra nueva lo antes posible y repetir la prueba, teniendo en cuenta la situación clínica del paciente.

## LIMITACIONES DE USO

---

1. El kit MICROSYPH™ TPHA1000 no contiene Células de Control. Por lo tanto, los resultados positivos pueden deberse a una reacción no específica de la muestra con las células. Con el fin de excluir esta posibilidad, todos los reactivos de la muestra de la prueba deben volver a comprobarse utilizando el kit MICROSYPH™ TPHA200 (FTPHA200).  
Para la confirmación de un resultado positivo, se debe utilizar la prueba FTA-ABS, ya que permite la diferenciación entre los anticuerpos IgG e IgM tempranos. La prueba FTA-ABS también resulta útil en sífilis muy tempranas, cuando la prueba de hemaglutinación puede ser negativa.  
Para el control terapéutico resulta aconsejable utilizar una prueba cuantitativa, por ejemplo, una prueba RPR. Axis-Shield Diagnostics Ltd. dispone de este reactivo
2. Aunque la prueba MICROSYPH™ TPHA1000 es muy específica, se sabe que se han producido falsos positivos en pacientes que padecen lepra, mononucleosis infecciosa y trastornos del tejido conjuntivo.
3. Las pruebas serológicas, incluida MICROSYPH™ TPHA1000, no pueden distinguir entre la sífilis y otras formas de infecciones por treponemas patógenos<sup>8</sup>, por ejemplo, frambesia<sup>7</sup>. Se deben utilizar evidencias clínicas para determinar qué condición está presente.
4. Los anticuerpos contra la sífilis detectados en la prueba MICROSYPH™ TPHA1000 persisten después de un tratamiento con éxito. Por lo tanto, una prueba positiva puede indicar una infección pasada o actual<sup>6,7,9,10</sup>.
5. Tras la infección con *T. pallidum*, los anticuerpos (tanto antilipoideos como antitreponémicos) pueden no aparecer hasta 1 a 4 semanas después de que se haya formado la lesión sifilítica característica. Por tanto, en la sífilis primaria temprana, pruebas tales como MICROSYPH™ TPHA1000 pueden proporcionar un resultado negativo en algunas muestras<sup>11,12,13</sup>. En estos casos, se deben utilizar procedimientos alternativos para la realización de las pruebas, por ejemplo, la identificación microscópica de *T. pallidum*.

6. Los resultados obtenidos utilizando sistemas de lectura de placas deben verificarse manualmente. Dependiendo de los parámetros de la lectura, algunos modelos indeterminados o colapsados pueden interpretarse erróneamente como límites o negativos.
7. Esta prueba se utiliza únicamente con muestras de plasma o suero individuales (no mezcladas).
8. El uso de muestras hemolizadas, suero no coagulado totalmente, muestras de plasma que contienen fibrina o muestras con contaminación microbiana puede dar lugar a resultados erróneos.

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### *Especificidad*

Se analizaron internamente 1000 muestras de donantes (500 de suero y 500 de plasma) con un lote de reactivos y otras 1000 muestras de donantes (500 de suero y 500 de plasma) con un segundo lote de reactivos; a continuación se indican los resultados.

Nº de Muestras	Lote de Reactivo	Nº de Muestras Positivas o Indeterminadas		Especificidad
		Inicial	Repetir	
500 Suero	1	0	0	100%
500 Plasma	1	2	0	100%
500 Suero	2	0	0	100%
500 Plasma	2	0	0	100%

### *Especificidad con muestras de posible reactividad cruzada*

71 muestras de posible reactividad cruzada fueron analizadas internamente con un lote de reactivos y otras 72 muestras fueron analizadas internamente con un segundo lote de reactivo; a continuación se indican los resultados.

Nº de Muestras	Lote de Reactivo	Nº de Muestras Positivas o Indeterminadas	Especificidad
71 (ver nota 1)	1	0	100%
72 (ver nota 2)	2	0	100%

Nota 1 : 18 muestras positivas factor reumatoideo, 9 positivas enfermedad de Lyme, 5 positivas anticardiolipina, 16 antenatal, 12 positivas HCV, 6 positivas HIV y 5 positivas HBV

Nota 2 : 18 muestras positivas factor reumatoideo, 9 positivas enfermedad de Lyme, 5 positivas anticardiolipina, 16 antenatal, 12 positivas HCV, 6 positivas HIV y 6 positivas HBV

### *Sensibilidad*

137 muestras que, utilizando los ensayos ELISA fueron positivas, se analizaron internamente con dos lotes de reactivos; los resultados aparecen indicados a continuación.

Nº de Muestras	Lote de Reactivo	Nº de Muestras Negativas	Sensibilidad
137	1	3	97.8%
137	2	2	98.5%

## NORMALIZACIÓN

Se ha demostrado que la prueba MICROSYPH™ TPHA1000 proporciona una reacción de aglutinación del 50% con la preparación de referencia WHO 3-1980 con una titulación entre 1/2560 y 1/10240 utilizando tres lotes de reactivos y cinco operadores.

## DEUTSCH: VERWENDUNGSZWECK

---

Der MICROSYPH™ TPHA1000 ist ein Schnelltest zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Humanserum oder Plasma (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma) durch indirekte Hämagglutination. Dieser Testkit ist als Suchtest für Screening-Untersuchungen konzipiert.

### EINLEITUNG

---

Bei Syphilis handelt es sich um eine durch *Treponema pallidum* Subspezies *pallidum* verursachte, sexuell übertragbare Infektionskrankheit. Da Treponemen nicht *in-vitro* kultiviert werden können, erfolgt die Diagnose von Syphilis mit Hilfe des klinischen Befundes und dem Nachweis spezifischer Antikörper durch serologische Tests. Serologische Syphilis-Suchtests unter Verwendung von Cardiolipin und Lecithin als Antigene sind einfach durchzuführen, es kommt jedoch häufig zu falsch positiven Reaktionen, da in diesen Tests keine Antigene aus *T. pallidum*<sup>1</sup> eingesetzt werden. Für TPI- und FTA-ABS-Tests wird pathogenes *T. pallidum* als Antigen verwendet, allerdings sind diese Tests in der Routineserodiagnostik problematisch. Für den TPI-Test ist lebendes pathogenes *T. pallidum* erforderlich und für den FTA-ABS-Test wird ein Fluoreszenzmikroskop benötigt. Für beide Tests sind umfangreiche Fachkenntnisse erforderlich.

TPHA-Assays haben sich als geeigneter und spezifischer Test in der Diagnose von Treponemeninfektionen erwiesen, sie zeigen eine ähnliche Spezifität, wie der TPI-Test<sup>6</sup> und eine Sensitivität, die mit derjenigen des FTA-ABS-Tests<sup>7</sup> vergleichbar ist. Sie benötigen ein Minimum an Laborausrüstung und sind sehr einfach durchzuführen. Bei Anfall grosser Probenserien können sie automatisiert durchgeführt werden.

### PRINZIP DES ASSAYS



---

MICROSYPH™ TPHA1000 dient dem Nachweis von humanen Antikörpern gegen *T. pallidum* in Serum oder Plasma nach dem Prinzip der indirekten Hämagglutination (IHA). Konservierte Hühnererythrozyten werden mit antigenen Bestandteilen des pathogenen *T. pallidum* (Stamm Nichols)<sup>2,3,4,5</sup> sensibilisiert. Diese Testzellen agglutinieren in Gegenwart spezifischer Antikörper gegen *T. pallidum* und bilden charakteristische Agglutinationsmuster in Mikrotiterplatten.

Antikörper gegen nicht pathogene Treponemen werden durch einen in der Zellsuspension befindlichen Extrakt von Reiter'schen Treponemen absorbiert. Die Testresultate liegen innerhalb von 60 Minuten vor, die Agglutinationsmuster sind einfach auswertbar und stabil.

Zur Vereinfachung des Probenverdünnungsschritts wurde dem Diluent ein blauer Farbstoff zugefügt. Die Farbe verändert sich nach Zugabe der Probe.

## BESTANDTEILE DES TESTKIT

Testzellen	2 × 40 ml	Mit <i>T. pallidum</i> Antigen sensibilisierte, konservierte Hühnererythrozyten in Pufferlösung. <input type="checkbox"/> Die Testzellen sind vor Gebrauch gründlich zu suspendieren. <input type="checkbox"/> Die Testzellen setzen sich während der Lagerung ab. <input type="checkbox"/> Es ist wichtig, dass die Zellen während der Lagerung bei 2° - 8° C mit Pufferlösung bedeckt sind.	
Diluent	1 × 250 ml	Pufferlösung enthält blauen Farbstoff und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel. <input type="checkbox"/> Gebrauchsfertig.	Xn 
Positive (reaktive) Kontrolle <b>CONTROL +</b>	1 × 0,5 ml	Humanserum mit Antikörpern gegen <i>T. pallidum</i> . Das verwendete Humanserum ist nicht reaktiv gegenüber Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HCV-, HIV-Antigen und HIV-Antikörpern, wenn der Nachweis mit von der FDA zugelassenen Tests durchgeführt wird. <input type="checkbox"/> Vor Gebrauch verdünnen.	
Negative (nicht reaktive) Kontrolle <b>CONTROL -</b>	1 × 0,5 ml	Humanserum mit Antikörpern gegen <i>T. pallidum</i> . Das verwendete Humanserum ist nicht reaktiv gegenüber Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HCV-, HIV-Antigen und HIV-Antikörpern, wenn der Nachweis mit von der FDA zugelassenen Tests durchgeführt wird. Enthält 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel. <input type="checkbox"/> Vor Gebrauch verdünnen.	Xn 

## LAGERUNG DER REAGENZIEN

Die in den jeweiligen Testkits enthaltenen Reagenzien sind aufeinander abgestimmt. Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen dürfen nicht gegeneinander ausgetauscht werden.

Der Testkit ist **aufrecht stehend** und bei 2° - 8° C zu lagern. Reagenzien dürfen nach ihrem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Reagenzien sind zu verwerfen, wenn sie verunreinigt sind oder mit den positiven bzw. negativen Kontrollen nicht die vorschriftsmäßige Reaktion erzielt wird.

Ein Testkit wurde ohne Beeinträchtigung seiner Funktion über einen Zeitraum von 52 Wochen fünf Mal geöffnet und geschlossen.

## PROBENSAMMLUNG UND AUFBEWAHRUNG

Es können Serum- oder Plasmaproben verwendet werden. Nach Zugabe eines Konservierungsmittels, z. B. 0,1% Natriumazid, können die Proben bei 2° - 8° C gelagert werden. Für eine Langzeitlagerung sind die Proben bei -20° C aufzubewahren. Vor einem Assay sind alle sichtbaren Feststoffe durch Zentrifugieren zu entfernen.

## PROBENVERDÜNNUNG

Die Proben, die positive und negative Kontrolle sind im Verhältnis 1 zu 20 mit Diluent zu verdünnen. Das Diluent enthält einen Farbstoff, dessen Farbe nach Zugabe der Proben oder Kontrollen von blau nach grün/gelb wechselt.

Zur spektralphotometrischen Überprüfung der Probenzugabe sind die Proben gemäß den Schritten 1 - 2 des Testprotokolls zu verdünnen. Vor der Durchführung von Schritt 3 ist die Mikrotiterplatte mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm und soweit verfügbar bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm zu messen. Wenn die optische Dichte (O.D.) unter 0,2 liegt, ist das vorliegende Probenvolumen zu gering und es ist eine neue Probenverdünnung anzufertigen.

Beachten Sie bitte, dass für die positiven und negativen Kontrollen wegen ihrer Zusammensetzung O.D.-Werte unter 0,2 erhalten werden können.

Verdünnte Proben und Kontrollen müssen innerhalb eines Arbeitstages verwendet werden.

# WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

---

## Nur für die Anwendung als In-vitro-Diagnostikum.

1. Die in dieser Testanleitung enthaltenen Anweisungen, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, sind genauestens zu befolgen.
2. Eine Kontamination von Reagenzien oder Proben mit Speichel ist unbedingt zu vermeiden, da hierdurch falsch positive Ergebnisse erhalten werden können.
3. Die Kontrollen enthalten Humanserum, welches mit von der FDA für Hepatitis-B-Oberflächenantigen, HCV-, HIV-Antigen und HIV-Antikörper zugelassenen Tests untersucht und als nicht reaktiv/negativ befunden wurde. Da kein bekannter Test die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen die Kontrollen als potentiell infektiös eingestuft und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien gehandhabt werden, die für andere potentiell gefährliche biologische Stoffe gelten. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (4. Auflage, 1999) beschreibt, wie derartige Stoffe unter Beachtung der "Good Laboratory Practice" (GLP) in den USA zu handhaben sind.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
6. Erkrankte Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und andere Hautläsionen ausreichend schützen.
7. Das Diluent und die negative Kontrolle enthalten 0,1% Natriumazid, welches gemäß der Direktive der Europäischen Gemeinschaft als schädlich (Xn) klassifiziert ist. Nachfolgend sind die entsprechenden Gefahren- (R) und Sicherheitshinweise (S) aufgeführt.

R22                   Gesundheitsschädlich bei Verschlucken

S35                   Dieses Material auf sichere Weise entsorgen

S36/37/39           Geeignete Arbeitsschutzkleidung, Schutzhandschuhe und Augen-  
Gesichtsschutz tragen

Auch wenn das vorhandene Natriumazid nur in niedriger Konzentration vorliegt, darf dieses nicht durch Ausgussbecken mit Geruchverschlüssen oder Abflussleitungen aus Metall entsorgt werden, um eine Explosionsgefahr aufgrund der Ansammlung von Blei- oder Kupfersalzen auszuschliessen. Nach dem Gebrauch sind die Abflüsse mit Wasser zu spülen.

8. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Stoffe sind auf Anfrage von Axis-Shield Diagnostics erhältlich.

## PRÄPARATION

---

### *Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien/Geräte*

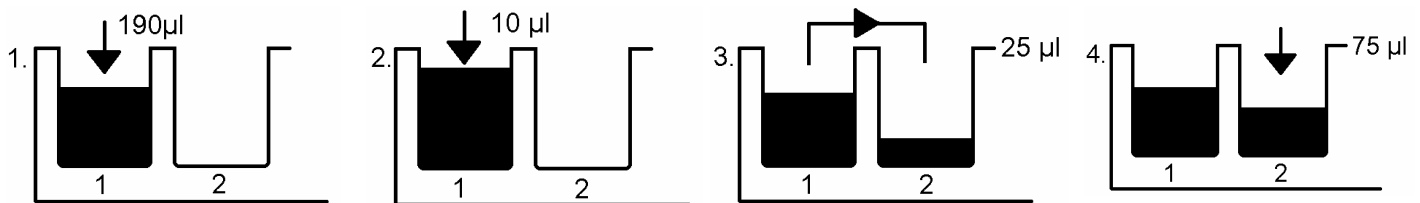
1. Präzise und in gutem Zustand befindliche Pipetten zum Abmessen von 10, 25, 75 und 190 Mikrolitern.
2. Starre Mikrotiterplatten mit U-förmigen Kavitäten.
3. Mikrotiterplattenphotometer und/oder Mikrotiterplattenprozessor (optional). Die Geräte sowie die Auswertungssoftware sind vor Gebrauch und Inbetriebnahme gemäß den Anweisungen des Herstellers zu validieren, zu pflegen und zu kalibrieren.

### *Geliefertes Material*

Der FTPHA1000 Testkit enthält ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 1000 manuellen Bestimmungen. Die Anzahl der mit automatischen Mikrotiterplattenprozessoren durchführbaren Bestimmungen ist abhängig von den individuellen Eigenschaften des Gerätes.

## TESTPROTOKOLL

1. Für jede Bestimmung werden 2 Kavitäten in der Mikrotiterplatte benötigt. Die Mikrotiterplatte mit einem sauberen, feuchten Lappen oder Papiertuch abwischen, um eine statische Aufladung zu vermeiden. 190  $\mu$ l Diluent in die Kavität 1 pipettieren.
2. 10  $\mu$ l der Probe in die Kavität 1 pipettieren. Den Inhalt von Kavität 1 mit einer Pipette mischen. Anmerkung: Für die positive und negative Kontrolle werden weitere Kavitäten benötigt. Die Kontrollen sind so zu behandeln, wie die Proben.
3. 25  $\mu$ l in die Kavität 2 übertragen.
4. 75  $\mu$ l der vollständig suspendierten Testzellen in die Kavitäten pipettieren, in denen sich 25  $\mu$ l der verdünnten Probe bzw. Kontrolle befinden.



5. Den Inhalt der Mikrotiterplatte mischen, dazu leicht an alle vier Seiten der Platte klopfen.
6. Mindestens 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.  
**Vorsicht: Die Mikrotiterplatte vor Wärme, direkter Sonneneinstrahlung und jeglichen Vibrationen schützen.**
7. Ergebnisse ablesen. Wenn ein Mikrotiterplattenphotometer eingesetzt wird, ist die Platte zuerst visuell zu lesen, da die Platte bei der Herausgabe aus dem Gerät möglicherweise geschüttelt wird.

## ABLESEN DER ERGEBNISSE

### *Visuell*

#### **Positives Ergebnis**

Ein stark positives Ergebnis erscheint als glatte Zellenmatte auf dem Boden der Kavität, manchmal mit Falten an den Rändern. Bei weniger stark reagierenden Proben ist diese Matte kleiner und kann innerhalb eines Zellenrings liegen.

#### **Negatives Ergebnis**

Ein negatives Ergebnis wird durch einen kompakten Zellenknopf mit oder ohne sehr kleinem mittigen Loch angezeigt.

#### **Fragliches Ergebnis**

Ein fragliches Ergebnis erscheint als Zellenknopf mit einem kleinen, mittigen Loch, es erscheint als deutlich definierter, dichter Ring auf einem ziemlich klaren Hintergrund.

#### **Kollabiertes Ergebnis**

Einige sehr stark positive Proben können in der 1:80 Verdünnung im Test kollabierende Agglutinationsmuster ergeben. Diese Muster sind mit dem eines fraglichen Ergebnisses vergleichbar, allerdings kann der dichte Ring gezackt (ausgefranst) sein.

### **Spektralphotometrisch**

Spektralphotometrisch erzielte Ergebnisse sind visuell zu überprüfen.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Die negative Kontrolle darf keine Agglutination verursachen, demgegenüber muss die positive Kontrolle in dem Test zur Agglutination führen. Sollte dieses nicht eintreten, ist der Test ungültig und die Ergebnisse dürfen nicht verwendet werden. Wenn der Test wiederholt wird, ist eine neue Verdünnung für jede Probe und jede Kontrolle anzufertigen.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

---

Zeigt eine Probe in dem Test ein positives Ergebnis, dann ist sie als reaktiv zu bewerten. Soweit im Einzelfall nicht anders vorgeschrieben, sind derartige Proben unter Verwendung der Originalprobe in Doppelbestimmung erneut zu testen. Proben, die in wenigstens einem der Wiederholungstests reaktiv sind, werden als wiederholt reaktiv in dem MICROSYPH™ TPHA1000 Test bewertet. Derartige Proben sind weiter zu untersuchen und die Ergebnisse des Tests sind zusammen mit anderen klinischen und/oder Analyseresultaten auszuwerten.

Ein negatives Ergebnis zeigt das Nichtvorhandensein von Antikörpern gegen *T. pallidum* an. In einigen Fällen von Frühsyphilis kann es zu einem negativen Ergebnis kommen (siehe dazu **Anwendungsgrenzen**).

Ein fragliches Ergebnis kann einen niedrigen Antikörperspiegel bei Frühsyphilis, eine behandelte Altsyphilis oder Framboesia anzeigen. In derartigen Fällen ist die Probe erneut zu testen. Sollte dies nicht möglich sein, ist möglichst umgehend dem Patienten eine neue Probe zu entnehmen und der Test ist zu wiederholen, dabei ist der klinische Zustand des Patienten zu berücksichtigen.

## ANWENDUNGSGRENZEN

---

1. Der MICROSYPH™ TPHA1000 Testkit enthält keine Kontrollzellen. Ein positives Ergebnis kann daher auf eine nicht spezifische Reaktion der Probe mit den Zellen zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sind die im Test reaktiven Proben unter Verwendung des MICROSYPH™ TPHA200 Testkits (FTPHA200) neu zu bestimmen.  
Zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses ist der FTA-Abs-Test einzusetzen, da hiermit eine Differenzierung zwischen IgG- und frühen IgM-Antikörpern möglich ist. Der FTA-Abs-Test ist darüber hinaus bei Frühsyphilis durchzuführen, da der Hämagglutinationsassay hier negativ ausfallen kann.  
Zur Therapiekontrolle ist ein quantitativer Nachweis, wie z. B. ein RPR-Test durchzuführen. Dieser Testkit ist von Axis-Shield Diagnostics Ltd erhältlich.
2. Obwohl der MICROSYPH™ TPHA1000 Test sehr spezifisch ist, ist das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen bei Patienten beobachtet worden, die an Lepra, infektiöser Mononukleose und Bindegewebserkrankungen leiden.
3. Serologische Tests, einschließlich des MICROSYPH™ TPHA1000 Tests, können nicht zwischen Syphilis und anderen Formen pathogener Treponemeninfektionen<sup>8</sup>, z. B. Framboesia<sup>7</sup>, unterscheiden. Welche Infektion vorliegt, ist anhand des klinischen Befundes zu ermitteln.
4. Die mit dem MICROSYPH™ TPHA1000 Test gefundenen Antikörper sind persistierend nach erfolgreicher Behandlung. Aus diesem Grunde kann ein positiver Nachweis frühere oder kürzliche Infektionen<sup>6,7,9,10</sup> anzeigen.
5. In Folge einer Infektion mit *T. pallidum* können innerhalb von 1 bis 4 Wochen nach Ausbildung der charakteristischen Syphilisläsion (Schanker) Antikörper (sowohl Lipoid- als auch Treponemenantikörper) auftreten. Bei früher Primärsyphilis können daher Tests, wie der MICROSYPH™ TPHA1000 bei einigen Proben<sup>11,12,13</sup> ein negatives Ergebnis ergeben. In diesen Fällen sind alternative Testmethoden einzusetzen, wie z. B. der mikroskopische Nachweis von *T. pallidum*.
6. Mit Mikrotiterplattenphotometern erzielte Ergebnisse sind visuell zu überprüfen. In Abhängigkeit von den Messparametern können einige fragliche oder kollabierte Agglutinationsmuster fälschlicherweise als Grenzfall oder negativ bewertet werden.
7. Dieser Test darf nur mit individuellen (unvermischten) Serum- oder Plasmaproben durchgeführt werden.
8. Bei Verwendung von hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen, fibrinhaltigen Plasmaproben bzw. bei mikrobiell verunreinigten Proben sind falsche Ergebnisse nicht auszuschließen.

## LEISTUNGSMERKMALE

### Spezifität

1.000 Proben von Blutspendern (500 Seren und 500 Plasmen) wurden mit einer Testkitcharge untersucht und weitere 1.000 Spenderproben (500 Seren und 500 Plasmen) wurden mit einer zweiten Testkitcharge untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Anzahl der Proben	Testkitcharge	Anzahl positiver oder fraglicher Proben		Spezifität
		Erst-nachweis	Wiederholung	
500 Serum	1	0	0	100%
500 Plasma	1	2	0	100%
500 Serum	2	0	0	100%
500 Plasma	2	0	0	100%

### Spezifität mit potentiell kreuzreaktiven Proben

71 potentiell kreuzreaktive Proben wurden mit einer Testkitcharge untersucht und weitere 72 Proben wurden mit einer zweiten Testkitcharge untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Anzahl der Proben	Testkitcharge	Anzahl positiver oder fraglicher Proben	Spezifität
71 (siehe Anmerkung 1)	1	0	100%
72 (siehe Anmerkung 2)	2	0	100%

Anmerkung 1 : 18 Rheumafaktor positive, 9 Lyme-Borreliose positive, 5 Anti-Cardiolipin positive, 16 pränatale, 12 HCV positive, 6 HIV positive und 5 HBV positive Proben.

Anmerkung 2 : 18 Rheumafaktor positive, 9 Lyme-Borreliose positive, 5 Anti-Cardiolipin positive, 16 pränatale, 12 HCV positive, 6 HIV positive und 6 HBV positive Proben.

### Sensitivität

137 mittels ELISA positiv gemessene Proben wurden mit zwei Testkitchargen untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Anzahl der Proben	Testkitcharge	Anzahl negativer Proben	Sensitivität
137	1	3	97,8%
137	2	2	98,5%

## STANDARDISIERUNG

Die Analyse der WHO-Referenzpräparation 3-1980 in einer Verdünnung zwischen 1/2560 und 1/10240 ergab mit dem MICROSYPH™ TPHA1000 Testkit eine 50%ige Agglutinationsreaktion in fünf unabhängigen Bestimmungen unter Verwendung von drei Testkitchargen.

## ITALIANO: INDICAZIONI PER L'USO

---

Il test MICROSYPH™ TPHA1000 è un dosaggio rapido per la determinazione di anticorpi specifici anti-*Treponema pallidum* nel siero o plasma umano (dipotassio EDTA, sodio citrato o litio eparina), basato sul principio della emoagglutinazione indiretta. Il kit è indicato per l'uso quale test iniziale di screening.

### INTRODUZIONE

---

La sifilide è una malattia venerea provocata dalla spirocheta *Treponema pallidum*. Dato che questo microrganismo non può essere coltivato *in vitro*, la diagnosi di sifilide dipende dalla correlazione tra i dati clinici e l'anticorpo specifico, determinato mediante test sierologici. Nonostante siano semplici da eseguire, i test di screening per la sifilide che utilizzano cardiolipina e lecitina come antigeni danno spesso origine a reazioni false positive biologiche (BFP), poiché utilizzano antigeni non treponemici<sup>1</sup>. I test TPI e FTA-ABS, pur utilizzando *T. pallidum* patogeno come antigene, presentano qualche difficoltà nella sierodiagnosi routinaria: per il TPI è necessario il *T. pallidum* patogeno vivo e per il FTA-ABS un microscopio a fluorescenza. Inoltre l'esecuzione di entrambi richiede un elevato grado di esperienza.

Il test TPHA si è dimostrato utile e specifico nella diagnosi di infezione treponemica, in quanto presenta una specificità sovrapponibile a quella del TPI<sup>6</sup> ed una sensibilità comparabile a quella del FTA-ABS<sup>7</sup>. Richiede un'attrezzatura di laboratorio minima ed è semplicissimo da eseguire. Per ottimizzare la capacità di elaborazione in laboratori con grosso volume di lavoro, può essere utilizzato congiuntamente ai sistemi automatizzati di manipolazione dei liquidi.

### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO



---

Il test MICROSYPH™ TPHA1000 rivela la presenza di anticorpi umani (siero/plasma) anti-*T. pallidum* mediante una metodica di emoagglutinazione indiretta (IHA). Le emazie aviarie conservate vengono rivestite con elementi antigenici di *T. pallidum* patogeno (ceppo di Nichol)<sup>2,3,4,5</sup>. Queste emazie test agglutineranno in presenza degli anticorpi specifici anti-*T. pallidum*, rivelando un pattern caratteristico nei pozzetti delle micropiastre.

Un estratto di treponemi di Reiter, incorporato nella sospensione cellulare, assorbe i treponemi non patogeni. I risultati del test sono disponibili entro 60 minuti e i pattern di agglutinazione cellulare sono facilmente leggibili e stabili.

Per facilitare la fase di diluizione, al diluente è stato aggiunto un colorante blu, che cambia colore quando il campione viene aggiunto.

## COMPONENTI DEL KIT

Emazie test	2 × 40ml	Emazie aviarie conservate, rivestite con antigene di <i>T. pallidum</i> sonicate in tampone. <input type="checkbox"/> <b>Le emazie test vanno risospese completamente prima dell'uso.</b> <input type="checkbox"/> <b>Le emazie test sedimentano durante la conservazione.</b> <input type="checkbox"/> <b>È importante che le emazie sedimentate siano coperte dal tampone durante la conservazione a 2-8°C.</b>	
Diluyente	1 × 250ml	Tampone contenente colorante blu. Contiene 0,1% di sodio azide come preservante. <input type="checkbox"/> <b>Pronto per l'uso.</b>	Xn 
Siero di controllo (positivo) reattivo  <b>CONTROL +</b>	1 × 0,5ml	Siero umano contenente anticorpi anti- <i>T. pallidum</i> . Il siero umano utilizzato, analizzato con metodiche approvate dalla FDA, si è dimostrato non reattivo all'antigene di superficie per il virus dell'epatite B, all'antigene dell'HCV, all'antigene e agli anticorpi dell'HIV. <input type="checkbox"/> <b>Diluire prima dell'uso.</b>	
Siero di controllo (negativo) non reattivo  <b>CONTROL -</b>	1 × 0,5ml	Il siero umano utilizzato, analizzato con metodiche approvate dalla FDA, si è dimostrato non reattivo all'antigene di superficie per il virus dell'epatite B, all'antigene dell'HCV, all'antigene e agli anticorpi dell'HIV. Contiene 0,1% di sodio azide come preservante. <input type="checkbox"/> <b>Diluire prima dell'uso.</b>	Xn 

## CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti di ciascun kit sono stati appositamente calibrati al fine di ottenere la reazione appropriata, per cui non vanno scambiati con quelli appartenenti a lotti diversi.

Conservare il kit in posizione **verticale** a temperature di 2-8°C. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Smaltire i reagenti contaminati o che non presentano l'attività corretta rispetto ai controlli reattivo e non reattivo.

Un kit è stato aperto e utilizzato in cinque differenti sedute analitiche, in un periodo di 52 settimane, ottenendo.

## RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È possibile utilizzare campioni sierici o plasmatici. Conservare a temperature di 2-8°C se, prima della conservazione, è stato aggiunto un preservante come 0,1% azide. Per la conservazione a lungo termine, conservare i campioni a -20°C. Prima di eseguire il test, eliminare gli eventuali aggregati visibili mediante centrifugazione.

## DILUIZIONE DEI CAMPIONI

Diluire 1:20 nel diluyente i campioni e i controlli reattivo e non reattivo. Il diluyente contiene un colorante blu che cambia visibilmente dal blu al verde/giallo pallido con l'aggiunta del campione.

Per avere la conferma spettrofotometrica dell'aggiunta del campione, diluire i campioni nel modo indicato ai punti 1-2 della sezione Protocollo per il dosaggio. Prima di procedere al punto 3, leggere la micropiastra in un lettore per piastra a 450nm, utilizzando una lunghezza d'onda di riferimento di 690nm, se disponibile. Se la densità ottica (DO) è inferiore a 0,2, si deve sospettare un campione di volume insufficiente; preparare quindi una nuova diluizione.

Nota: considerato che i controlli reattivo e non reattivo possono dare valori di DO inferiori a 0,2 a causa della loro composizione, particolare cautela è richiesta nel verificare che il controllo venga aggiunto.

Utilizzare le diluizioni il giorno stesso della preparazione.

# AVVERTENZE E PRECAUZIONI

---

## *Per solo uso diagnostico in vitro.*

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. Non contaminare i reagenti o i campioni con la saliva, per evitare di ottenere pattern fuorvianti, simili a un risultato positivo in campioni che dovrebbero essere negativi.
3. I controlli contengono siero umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'antigene di superficie per il virus dell'epatite B, l'antigene verso il virus dell'epatite C, l'antigene e gli anticorpi dell'HIV e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopericolosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª edizione, 1999, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo è applicabile negli Stati Uniti d'America.
4. Non pipettare con la bocca.
5. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
6. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
7. Il diluente e il controllo non reattivo contengono 0,1% di sodio azide, classificata come nociva (Xn) dalle direttive applicabili della Comunità Economica Europea. Di seguito vengono riportate le frasi appropriate di rischio (R) e sicurezza (S):

R22 Nocivo se ingerito

S35 Smaltire questo materiale in modo sicuro

S36/37/39 Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggere gli occhi/il viso.

Nonostante la bassa concentrazione di azide, questi materiali non vanno comunque smaltiti in lavandini dotati di sifone intercettatore o tubi di scarico metallici, per evitare l'accumulo di sali esplosivi di piombo o di rame. Dopo l'uso, spurgare gli scarichi con acqua abbondante.

8. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Axis-Shield Diagnostics.

## PREPARAZIONE

---

### *Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti*

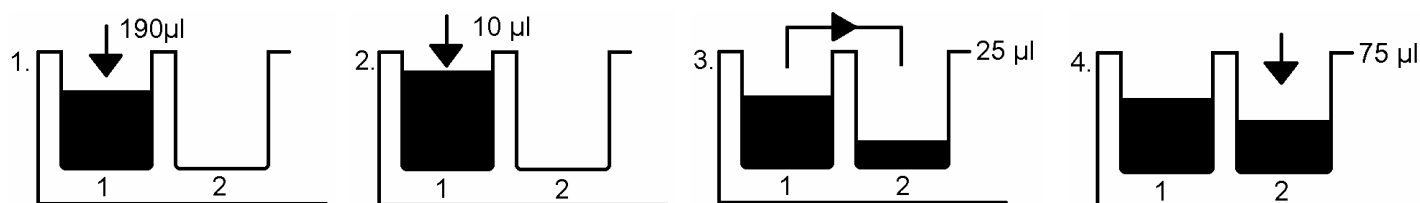
1. Pipette accurate e pulite correttamente, capaci di dispensare 10, 25, 75 e 190 microlitri.
2. Micropiastre rigide con pozzetti a U.
3. Sistema di lettura per micropiastre e/o processori automatizzati (opzionali). Gli strumenti ed il software di interpretazione devono essere convalidati prima dell'uso e della messa in funzione; la manutenzione e calibrazione vanno inoltre eseguite conformemente alle istruzioni del produttore.

### *Materiali in dotazione*

Il kit FTPHA1000 contiene reagenti in quantità sufficiente a eseguire manualmente 1000 test. Il numero di test ottenuti con i sistemi automatizzati dipende dalle caratteristiche del sistema utilizzato.

## PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO

1. Due pozzetti di una micropiastra sono necessari per l'esecuzione di ogni singolo test. Pulire la micropiastra con un panno o carta assorbente pulita, umida per eliminare la carica statica. Aggiungere 190  $\mu$ l di diluente nel pozzetto 1.
2. Aggiungere 10  $\mu$ l di campione nel pozzetto 1, quindi miscelare il contenuto con una pipetta. Nota: sono necessari due ulteriori set di pozzetti per i controlli reattivo e non reattivo. I controlli vanno trattati esattamente come i campioni.
3. Trasferire 25  $\mu$ l nel pozzetto 2.
4. Aggiungere 75  $\mu$ l di emazie test risospese nei pozzetti contenenti 25  $\mu$ l di campione o controllo diluito.



5. Miscelare il contenuto della micropiastra picchiando su ognuno dei quattro lati.
6. Incubare a temperatura ambiente per almeno 60 minuti.  
**Attenzione: tenere la micropiastra lontano da fonti di colore, dalla luce solare diretta e da qualsiasi fonte di vibrazione.**
7. Leggere i risultati. Se viene utilizzato un lettore, leggere dapprima la micropiastra ad occhio nudo, poiché il lettore potrebbe agitarla quando la si espelle dallo strumento.

## LETTURA DEI RISULTATI

### *Letture visiva*

#### **Risultato positivo**

Un positivo forte appare come un tappeto omogeneo di cellule che copre il fondo del pozzetto, talvolta ripiegato ai margini. Nei campioni meno reattivi, il tappeto è più piccolo e può essere circondato da un anello di cellule.

#### **Risultato negativo**

Un risultato negativo è indicato da un bottone compatto di cellule con o senza un piccolissimo foro al centro.

#### **Risultato indeterminato**

Un risultato indeterminato mostra un bottone di cellule con un piccolo foro al centro, che ha l'apparenza di un anello ben definito contro un alone relativamente chiaro intorno.

#### **Risultato collassato**

Alcuni campioni molto positivi possono presentare pattern dai margini ripiegati ad una diluizione 1:80. Tali pattern sono simili a quelli del risultato indeterminato, ma presentano un anello denso che talvolta assume un aspetto irregolare.

### *Letture spettrofotometrica*

Controllare manualmente anche i risultati ottenuti mediante spettrofotometria.

## CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Il controllo non reattivo al test non dovrebbe causare agglutinazione, mentre quello reattivo dovrebbe dare un sedimento di cellule agglutinate. In caso contrario, il test va considerato invalido e i risultati del campione del paziente non vanno riportati. Se si ripete il dosaggio, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

---

I campioni che danno un risultato positivo al test vanno considerati come reattivi. Salvo disposizioni contrarie nelle procedure locali, tali campioni devono essere analizzati nuovamente in duplicato utilizzando il campione originale. I campioni reattivi ad almeno uno dei test duplicati sono considerati ripetutamente reattivi al dosaggio MICROSYPH™ TPHA1000. Questi campioni devono essere dosati ulteriormente e i risultati del test devono essere valutati alla luce di altri dati clinici e/o analitici. Un risultato negativo indica l'assenza di anticorpi anti-*T. pallidum*. In alcuni casi di sifilide ai primissimi stadi, è possibile ottenere un risultato negativo (si rinvia alla sezione **Limitazioni della metodica**).

Un risultato indeterminato può indicare un basso livello anticorpale nella sifilide ai primi stadi, pregressa infezione sifilitica trattata o framboesia, nel qual caso il campione va rianalizzato. Qualora ciò fosse impossibile, raccogliere un nuovo campione al più presto e ripetere il test, valutando lo stato clinico del paziente.

## LIMITI D'IMPIEGO

---

1. Il kit MICROSYPH™ TPHA1000 non contiene emazie di controllo, per cui un risultato positivo potrebbe essere imputabile ad una reazione aspecifica del campione con le emazie. Per escludere tale possibilità, il campione reattivo al test deve essere dosato nuovamente utilizzando il kit MICROSYPH™ TPHA200 (FTPHA200).

Per confermare un risultato positivo, si dovrebbe utilizzare il test FTA-ABS, poiché consente di differenziare tra gli anticorpi IgG e quelli IgM precoci. Il test FTA-ABS si rivela utile anche nei primissimi stadi di sifilide, laddove il test di emoagglutinazione potrebbe risultare negativo.

Per il controllo terapeutico, si consiglia di impiegare un test quantitativo, come il test RPR. Questo reagente è disponibile presso Axis-Shield Diagnostics Ltd.

2. Nonostante l'elevata specificità del test MICROSYPH™ TPHA1000, è noto che la metodica TPHA può dare origine a risultati falsi positivi in pazienti affetti da lebbra, mononucleosi infettiva e patologie del connettivo.
3. Considerato che i test sierologici, compreso MICROSYPH™ TPHA1000, non sono in grado di differenziare la sifilide da altre forme di infezione treponemica patogena<sup>8</sup>, ad es. framboesia<sup>7</sup>, la diagnosi della patologia deve basarsi sull'evidenza clinica.
4. Dal momento che anticorpi della sifilide, rivelati dal test MICROSYPH™ TPHA1000, permangono dopo il trattamento riuscito, un risultato positivo può indicare un'infezione pregressa o in atto<sup>6,7,9,10</sup>.
5. Dopo l'infezione con *T. pallidum*, è possibile che gli anticorpi (antilipoidei e antitreponemici) non compaiano fino a 1 - 4 settimane dopo la comparsa della caratteristica lesione sifilitica (sifiloma). Ne consegue che i test precoci di sifilide primaria, come il MICROSYPH™ TPHA1000, possono dare origine a un risultato negativo in alcuni campioni<sup>11,12,13</sup>. In questi casi è buona regola utilizzare altre metodiche di analisi, ad es. l'identificazione microscopica di *T. pallidum*.
6. I risultati ottenuti utilizzando i sistemi di lettura per micropiastre devono essere controllati manualmente. A seconda dei parametri di lettura, è possibile interpretare erroneamente come borderline alcuni pattern indeterminati o collassati.
7. Questo test deve essere utilizzato esclusivamente con campioni sierici o plasmatici individuali (non provenienti da un pool).
8. L'uso di campioni emolizzati, sieri parzialmente coagulati, campioni plasmatici contenenti fibrina o campioni che presentano contaminazione microbica possono dare origine a risultati erranei.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### *Specificità*

1000 campioni di donatori (500 sierici e 500 plasmatici) sono stati analizzati internamente con un lotto di reagenti ed ulteriori 1000 campioni di donatori (500 sierici e 500 plasmatici) con un secondo lotto di reagenti; i risultati sono riportati nella tabella che segue.

N. di campioni	Lotto dei reagenti	N. di campioni positivi o indeterminati		Specificità
		Iniziale	Ripetuto	
500 sierici	1	0	0	100%
500 plasmatici	1	2	0	100%
500 sierici	2	0	0	100%
500 plasmatici	2	0	0	100%

### *Specificità con campioni con potenziale reattività crociata*

71 campioni con potenziale reattività crociata sono stati analizzati internamente utilizzando un lotto di reagenti ed ulteriori 72 campioni con un secondo lotto di reagenti; i risultati sono riportati nella tabella che segue.

N. di campioni	Lotto dei reagenti	N. di campioni positivi o indeterminati	Specificità
71 (vedi nota 1)	1	0	100%
72 (vedi nota 2)	2	0	100%

Nota 1 : 18 campioni positivi al fattore reumatoide, 9 positivi alla malattia di Lyme, 5 anticardiolipina positivi, 16 antenatali, 12 HCV positivi, 6 HIV positivi e 5 HBV positivi

Nota 2 : 18 campioni positivi al fattore reumatoide, 9 positivi alla malattia di Lyme, 5 anticardiolipina positivi, 16 antenatali, 12 HCV positivi, 6 HIV positivi e 6 HBV positivi

### *Sensibilità*

137 campioni risultati positivi utilizzando il dosaggio ELISA sono stati analizzati internamente con due lotti di reagenti; i risultati sono riportati nella tabella che segue.

N. di campioni	Lotto dei reagenti	N. di campioni negativi	Sensibilità
137	1	3	97,8%
137	2	2	98,5%

## STANDARDIZZAZIONE

È stato dimostrato che il test MICROSYPH™ TPHA1000 dà una reazione di agglutinazione del 50% con il preparato di riferimento OMS 3-1980 ad una titolazione compresa tra 1/2560 e 1/10240 utilizzando tre lotti di reagenti e cinque operatori.

## REFERENCES/REFERENCIAS / REFERENCIAS/VERWEISE/BIBLIOGRAPHIA

---

1. **Garner, M.F. et al** (1973). The *Treponema pallidum* haemagglutination (TPHA) test in biological false positive and leprosy sera. *J. Clin. Path.*, **26**, 258.
2. **Rathlev, T.** (1965). Haemagglutination tests utilising antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. W.H.O./VDT/RES/77.65.
3. **Rathlev, T.** (1967). Haemagglutination test utilising pathogenic *Treponema pallidum* for the sero-diagnosis of syphilis. *Brit. J. Vener. Dis.*, **43**, 181.
4. **Tomizawa, T. et al.** (1966). Hemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **19**, 305.
5. **Tomizawa, T. et al.** (1969). Usefulness of the hemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **22**, 341.
6. **Sequeira, P.J.L. et al** (1973). Treponemal haemagglutination test. *Brit. J. Vener. Dis.*, **49**, 242.
7. **Johnston, N.A.** (1972). *Treponema pallidum* haemagglutination test for syphilis. Evaluation of a modified micro-method. *Brit. J. Vener. Dis.*, **48**, 474.
8. **Cox, P.M. et al.** (1969). Automated, quantitative microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies. *Appl Microbiol.*, **18**, 485.
9. **Uete, T. et al** (1971). Clinical evaluation of the *T. pallidum* haemagglutination test. *Brit. J. Vener. Dis.*, **47**, 73.
10. **Young, H. et al** (1974). *Treponema pallidum* haemagglutination test as a screening procedure for the diagnosis of syphilis. *Brit. J. Vener. Dis.* **50**, 341. *Appl. Microbiol.*, **24**, 26.
11. **Coffrey, E.M. et al** (1972). Evaluation of the qualitative and automated quantitative microhemagglutination assay for antibodies to *Treponema pallidum*. *Appl. Microbiol.* **24**, 26.
12. **Dyckman, J.D. et al** (1980). Reactivity of microhemagglutination, fluorescent treponemal antibody absorption, and venereal disease research laboratory tests in primary syphilis. *J. Clin. Micro.*, **12**, 629.
13. **Larsen, S.A. et al** (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Micro. Rev.*, **8**, 1. *Clin. Micro. Rev.*, **8**, 1.

## SYMBOLS



For in vitro diagnostic use I  
Pour diagnostic in vitro I Para uso diagnóstico in vitro I  
In Vitro Diagnosticum I Per uso diagnostico in vitro



Catalogue number I  
Numéro catalogue I Número de catálogo I  
Bestellnummer I Numero di catalogo



Lot I  
Lot I Lote I  
Ch.-B. I Lotto



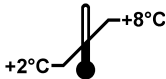
1000 tests I  
1000 determinations I 1000 pruebas I  
1000 Bestimmungen I 1000 tests



ATTENTION See instructions for use I  
Voir les consignes d'utilisation I Ver las instrucciones de uso I  
Gebrauchsinformation beachten I Vedere le istruzioni per l'uso



Use by I  
Utiliser avant I Utilizar antes de I  
Verwendbar bis I Scadenza



Store at 2-8°C I  
Conserver à 2-8°C I Conservar a 2-8°C I  
Lagerung bei 2-8°C I Conservare a 2-8°C



Positive (Reactive) Control I  
Témoin positif I Control Positivo I  
Positiv-Kontrolle I Controllo Positivo



Negative (Non-Reactive) Control I  
Témoin négatif I Control Negativo I  
Negativ-Kontrolle I Controllo Negativo