



200 tests 72501

500 tests 72502



TPHA TESTS

Kits for the qualitative and semi-quantitative detection of antibody to *Treponema pallidum* in human serum or plasma by passive haemagglutination



Newmarket Laboratories Ltd
Lanwades Business Park,
Kentford, Newmarket, CB8 7PN – UK

Distributed by:

Bio-Rad
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes - la - coquette - France



TPHA 200 Code 72501

200 tests

TPHA Screening 500 Code 72502

500 tests

Kits de détection qualitative et semi-quantitative d'anticorps à *Treponema pallidum* dans le sérum ou le plasma humains par hémagglutination passive

IVD

Contrôle de qualité du fabricant Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par notre société.

Considérations cliniques générales

La syphilis est une infection chronique comprenant quatre phases distinctes : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. Celles-ci s'accompagnent de divers symptômes cliniques dont des lésions (ulcérations) initiales appelées chancres, suivies d'éruptions cutanées ou muqueuses puis de longues périodes de latence. Non traitée, l'infection peut finir par entraîner des troubles cardio-vasculaires et neurologiques.

L'infection est causée par un spirochète, *Trepanoma pallidum*, transmis généralement par contact sexuel, bien que la syphilis puisse également être transmise par transfusion de sang infecté ; il peut aussi y avoir une transmission intra-utérine. Le tréponème s'est avéré pratiquement impossible à cultiver en milieu artificiel, et le diagnostic de l'infection repose généralement sur la détection d'anticorps dans le sang, qui apparaissent peu après l'infection initiale.

Les tests pour la syphilis peuvent être classés en quatre catégories : examen microscopique direct ; tests aux anticorps tréponémiques ; tests aux anticorps non tréponémiques ; et tests antigéniques directs. Etant donné les longues périodes de latence de la maladie et la nature non spécifique des tests non tréponémiques, les méthodes permettant de détecter des anticorps anti-tréponémiques spécifiques dans les échantillons de sang sont de plus en plus utilisées pour le dépistage. Le **TPHA** est l'un de ces tests.

Usage prévu

Ces kits sont destinés à être utilisés par le personnel formé et qualifié approprié pour détecter les anticorps à *Treponema pallidum* dans le sérum et le plasma humains.

Principe du test

Les kits TPHA 200 et TPHA Screening 500 font appel à des hématies aviaires spécialement conservées sensibilisées d'antigènes de *T. pallidum* (souche de Nichols), qui se lieront aux anticorps spécifiques présents dans le sérum ou plasma du patient. Ces cellules sont en suspension dans un milieu contenant des substances destinées à éliminer les réactions non spécifiques. Les réactions positives sont indiquées par l'agglutination de ces hématies et les réactions négatives par la formation d'un précipité de ces hématies en forme de bouton ou de petit anneau.

Bien que ce kit soit destiné avant tout à être un test qualitatif, il permet aussi de titrer les taux d'anticorps par dilution successive au-demi.

Les résultats de l'agglutination peuvent être interprétés à l'œil nu ou à l'aide d'un lecteur de plaque capable de discerner les différents types d'agglutination.

Contenu du kit

	Produit	Réactif	TPHA 200 (200 tests) 72501	TPHA Screening 500 (500 tests) 72502
R1	Cellules pour le test	Hématies de poulet conservées sensibilisées d'antigènes de <i>T. pallidum</i>	2 x 8,5 ml	2 x 20 ml
R2	Cellules de contrôle	Hématies de poulet conservées non sensibilisées	2 x 8,5 ml	20 ml
R3	Diluant	Solution saline contenant des agents absorbants	2 x 20 ml	125 ml
R4	Contrôle positif	Sérum humain Titre compris entre 640 et 2560	0,5ml	0,5 ml
R5	Contrôle négatif	Sérum humain Titre : <80	0,5ml	0,5 ml
Mode d'emploi				

Avertissements et précautions

Produits destinés au diagnostic in vitro seulement

Tous les réactifs contiennent de l'azide de sodium (à moins de 0,1 % p/v). Les déchets liquides provenant de l'utilisation de ce test doivent être dilués dans de grandes quantités d'eau afin d'éviter l'accumulation de substances pouvant présenter un risque d'explosion dans la plomberie d'un laboratoire.

Les substances de contrôle fournies proviennent de sérum humain. Elles ont été contrôlées au niveau du donneur et se sont révélées négatives pour l'hépatite B et C et le VIH 1 et 2. **Cependant, elles devront être traitées comme potentiellement infectieuses.**

Les échantillons de sérum et de plasma humains devront être traités comme présentant des risques au point de vue microbiologique, et manipulés conformément aux règlements/consignes applicables.

Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption.

Ne pas combiner ou permuter les réactifs de kits de lots différents.

Conservation

Conserver le kit entre 2 et 8 °C lorsqu'il n'est pas utilisé. Stocker les flacons verticalement. **Ne pas congeler.**

Durée de conservation : voir date sur l'étiquette du kit.

Matériel requis

Des dispositifs de pipetage correctement étalonnés et entretenus capables de distribuer des volumes de 10, 25, 75 et 190 µl.

Microplaques à 96 puits (plaque à fond en U) – code 83378 (5 plaques), 83357 (100 plaques)

Echantillons

Les échantillons de sérum ou de plasma ne doivent pas contenir de cellules sanguines ou d'agents contaminants microbiens évidents. Ils peuvent être stockés entre 2 et 8°C pendant 7 jours avant d'être testés. Les échantillons devant être conservés plus longtemps devront être congelés à – 20°C minimum. Les échantillons congelés devront être décongelés et bien mélangés avant le test.

Protocole de l'essai (manuel)

Avant utilisation, laisser tous les réactifs et échantillons atteindre la température ambiante.

Remarque : les contrôles positifs et négatifs du kit doivent être utilisés avec chaque lot de tests.

Essai qualitatif

Trois puits sont nécessaires pour chaque échantillon.

NB Le kit TPHA Screening 500 (code produit 72502) est destiné au dépistage sur de grands nombres d'échantillons mais ne contient qu'un faible volume de cellules de contrôle. Il est conçu de manière à ce qu'en premier lieu les échantillons ne soient testés qu'avec des cellules de test, les cellules de contrôle n'étant utilisées que pour les tests répétés avec les échantillons positifs au premier test.

1 Dilution de l'échantillon (au 20^{ème})

Distribuer 190 µl de diluant dans un puits.

Ajouter 10 µl d'échantillon dans le même puits.

Bien mélanger.

Remarque : les contrôles positifs et négatifs fournis doivent être traités comme les échantillons (c-à-d. dilués au 20^{ème})

2 Test

Ajouter 25 µl d'échantillon dilué de l'étape 1 dans le puits de test.

Ajouter 25 µl d'échantillon dilué de l'étape 1 dans le puits de contrôle.

Remettre en suspension les cellules de test et de contrôle en secouant le flacon. Bien vérifier qu'elles ont été complètement remises en suspension.

Ajouter 75 µl de cellules de test dans le puits de test et 75 µl d'hématies de contrôle dans le puits de contrôle (*la dilution finale de l'échantillon après l'addition des cellules est donc au 80^{ème}*)

Bien mélanger.

Incuber à la température ambiante (15 à 30 °C) sur une surface sans vibrations pendant 45 minutes minimum.

Déterminer s'il y a eu agglutination ou non – celle-ci est stable pendant au moins trois heures si on ne touche pas à la plaque.

Essai quantitatif

9 puits sont nécessaires pour chaque échantillon.

Remarque : les contrôles positifs et négatifs du kit doivent être utilisés avec chaque lot de tests, en suivant la procédure quantitative donnée ci-dessous.

1 Dilution des échantillons (au 20^{ème})

Distribuer 190 µl de diluant dans un puits.

Ajouter 10 µl d'échantillon dans le même puits.

Bien mélanger.

Remarque : les contrôles positifs et négatifs fournis doivent être dilués comme les échantillons (c-à-d. au 20^{ème})

2 Titrage

En laissant le 1^{er} puits vide, distribuer 25 µl de diluant dans chacun des 7 puits restants d'une rangée de 8 puits.

Ajouter 25 µl de l'étape 1 dans le 1^{er} puits.

Ajouter 25 µl de l'étape 1 dans le 2^{ème} puits et mélanger, puis diluer en série le long de la rangée de puits en jetant les 25 µl excédentaires du puits final.

3 Test

Mélanger doucement les cellules de test afin d'assurer une remise en suspension complète.

Distribuer 75 µl de cellules dans chaque puits (*la plage de dilution finale des échantillons après addition de la suspension de cellules est de 1 à 80 – 1 à 10 240*).

Bien mélanger.

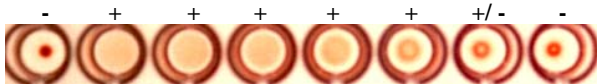
Incuber à la température ambiante (15 à 30°C) sur une surface sans vibrations pendant 45 mn minimum. Déterminer s'il y a eu agglutination. Celle-ci est stable pendant au moins trois heures si on ne touche pas à la plaque.

Le titre de l'échantillon est l'inverse de la plus haute dilution ayant donné une agglutination.

Interprétation et validation de l'essai

Contrôle de qualité interne

Pour que les résultats soient valides, le contrôle négatif doit donner un résultat négatif (voir illustration guide d'interprétation ci-dessous) et le contrôle positif doit donner un titre de 640 à 2560 (voir illustration pour déterminer le point de fin de titrage).



CC 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 1:2560 1:5120

Tout échantillon donnant une agglutination moins marquée que celle indiquée sous + / - ci-dessus est négatif.

TPHA Screening 500 - interprétation des résultats

Tout échantillon donnant une agglutination plus marquée que celle indiquée sous + / - ci-dessus doit être interprété provisoirement comme **positif**, et la procédure de test répétée comme ci-dessus, cette fois en double, en ajoutant la suspension de cellules de contrôle dans une série de puits et les cellules de test dans une autre.

TPHA 200 - interprétation des résultats

	Cellules de test	Cellules contrôles
Positif fort	Couche régulière de cellules couvrant le fond du puits	Bouton négatif
Positif faible	Couche régulière de cellules couvrant environ 1/3 du fond du puits	Bouton négatif
Indéterminé	Couche de cellules nettement manquante au centre	Bouton négatif
Négatif	Cellules formant un dépôt en forme de bouton compact, souvent avec un petit centre transparent	Bouton négatif
Réaction NON spécifique	Réaction positive	Bouton positif

Absorption des réactions non spécifiques (procédure à utiliser si l'on détecte une agglutination avec à la fois les cellules de test et de contrôle)

1. Ajouter 10 µl d'échantillon à 190 µl de cellules de contrôle remises en suspension, bien mélanger et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
2. Centrifuger à 1500 g pendant 3 mn minimum pour déposer les cellules.
3. Ajouter 25 µl du liquide surnageant provenant de l'étape 2 dans les 2 puits.
4. Mélanger doucement les cellules de test et de contrôle afin d'assurer une remise en suspension complète.

Ajouter 75 µl de cellules de test dans le 1^{er} puits.

Ajouter 75 µl de cellules de contrôle dans le 2^{ème} puits.

Bien mélanger et incuber à température ambiante pendant 45 mn minimum.

Lire et interpréter les résultats comme ci-dessus.

Caractéristiques de performances

Spécificité

Deux études indépendantes sur les **sérums de 2900 donneurs** ont chacune montré une concordance à 100 % avec les méthodes de test existantes. Le taux de réaction initial était de 0,1%, et le taux de réaction répété était de 0 %.

Une étude indépendante portant sur 200 **sérums de patientes enceintes** a indiqué une spécificité de 100 % (95% avec des limites de confiance de 98,04 à 100 %)

Sensibilité

Des études en interne sur 110 échantillons de sujets positifs connus ont donné 100 % de résultats positifs (95% avec des intervalles de confiance de 98,04 à 100 %). Ce nombre comprenait 2 échantillons négatifs selon d'autres tests TPHA disponibles dans le commerce, mais qui se sont révélés positifs à des tests FPA et EIA à IgM spécifiques.

Echantillons cliniques

467 échantillons de patients chez lesquels on soupçonnait une syphilis ont été testés dans un laboratoire d'analyses médicales.

Catégorie clinique	Nombre testé	Réactifs au TPHA Screening 500 et au TPHA 200	Réactifs à d'autres tests TPHA
Positifs pour la syphilis *	217	216	214
Négatifs pour la syphilis	250	0	0

* Comprenant des cas traités, non traités et de neurosyphilis

Sensibilité 99,5 % (95% avec des limites de confiance de 97,54 à 100 %)

Spécificité 100 % (95% avec des limites de confiance de 98,04 à 100 %)

Spécificité avec des échantillons présentant des réactions croisées potentielles

Catégorie clinique	Nombre testé	Réactifs au TPHA Screening 500 et au TPHA 200	Non-réactifs au Dépistage TPHA 500 et au TPHA 200
Facteur rhumatoïde	10	0	10
Infection à l'EBV	10	0	10
Post - Vaccination hépatite B	10	0	10
SLE (lupus érythémateux aigu disséminé)	10	0	10
Herpès génital	10	0	10
Maladie de Lyme	10	0	10
Leptospirose	10	1	9

Sensibilité analytique

On a pu montrer que ce kit est capable de détecter 0,05 UI /ml d'anticorps anti-tréponémiques en testant des dilutions de sérum du Premier Etalon International (NIBSC, Londres, G-B).

Précision et exactitude

Pour N =10 essais d'un échantillon positif, le CV = 8,1 % Exactitude = - 2,5 %

Bibliographie

1. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDT/RES 1965 ; 77 : 65.
2. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308, 1966.
3. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5
4. Tomizawa T, Kasamatsu S, Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969 ; 22 : 341-50.
5. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973 ; 49 : 242-8.
6. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981 ; 14 : 441 – 445.
7. Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. – Tréponématoses : aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol. 1991a ; 23 : 88-89.
8. Houg H. - Syphilis : new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992 ; 3 : 391-413.
9. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis : a review. Genitourin Med. 1992 ; 68 : 413-9.
10. Dagué G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995 ; 120 :5-30.
11. North M, Guntz Ph. Sérodiagnostic de la syphilis. La Revue Française des Laboratoires, 1997 ; 294 : 51-58.



UK Use By
DE Verwendbar bis
ES Fecha de caducidad
IT Utilizzare entro
FR Utiliser jusque
NL Houdbaar tot
DK Holdbar til
P Fecha de caducidad



UK Temperature limitation
DE Zulässiger Temperaturbereich
ES Limite de temperatura
IT Limiti di temperatura
FR Limites de température
NL Temperatuurlimiet
DK Temperaturbegrænsning
P Limite de temperatura



UK Manufacturer
DE Hersteller
ES Fabricante
IT Fabbricante
FR Fabricant
NL Fabrikant
DK Producent
P Fabricante



UK Consult Instructions for Use-
DE Gebrauchsanweisung beachten
ES Consulte las instrucciones de uso
IT Consultare le istruzioni per l'uso
FR Consulter les instructions d'utilisation
NL Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
DK Se brugsanvisning
P Consulte las instrucciones de uso



UK In Vitro Diagnostic Medical Device
DE In Vitro Diagnostikum
ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro
IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro
FR Dispositif médical de diagnostic in vitro
NL Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
DK Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
P Producto sanitario para diagnóstico in vitro



UK Batch code
DE Lagenbezeichnung
ES Código de lote
IT Codice del lotto
FR Code du lot
NL Lot number
DK Lotnummer
P Código de lote

72501-72502 CE MOD2 2007/01