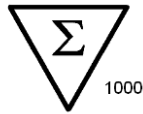




MICROSYPH™ TPHA1000

IVD

REF FTPHA1000



Usage reserve aux professionnels



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
Web: www.axis-shield.com

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 tréponémiques¹. 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 TPI⁶ et une sensibilité comparable à celle du test FTA-ABS⁷. 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)²⁻⁵. 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

TEST CELLS	2 × 40mL	<p>Hématies aviaires revêtus d'antigène de <i>T. pallidum</i> soumis à sonication dans une solution tampon.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Les Cellules de Test doivent être soigneusement remises en suspension avant usage. <input type="checkbox"/> Lors du stockage, les Cellules de Test se déposent. <input type="checkbox"/> Les cellules déposées doivent être recouvertes avec le tampon pendant le stockage à 2-8°C.
DIL	1 × 250mL	<p>Tampon contenant un colorant bleu et de l'azide de sodium à 0.1% comme conservateur.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Prêt à l'emploi.
CONTROL +	1 × 0.5mL	<p>Défibriné plasma syphilitique humain contenant des anticorps dirigés contre <i>T. pallidum</i>. Le plasma 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.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> A diluer avant usage.
CONTROL -	1 × 0.5mL	<p>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.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> A diluer avant usage.

CONSERVATION DES REACTIFS

Les réactifs de chaque trousse ont été associés pour produire la réaction appropriée ; les réactifs ne doivent pas être interchangés 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 ou plasma 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. Département d'état de la santé et des services sociaux des Etats-Unis (US Department of Human Health Services) "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*", 5ème édition, Washington, DC: US Government Printing Office, janvier 2007,¹⁴ décrit comment ces matériaux doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
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%.

Diluant	EUH032	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
Témoin négatif		

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 contenus dans cette trousse sont disponibles sur demande auprès de Axis-Shield Diagnostics.

PREPARATION

Matériel/Equipement nécessaire mais non fourni

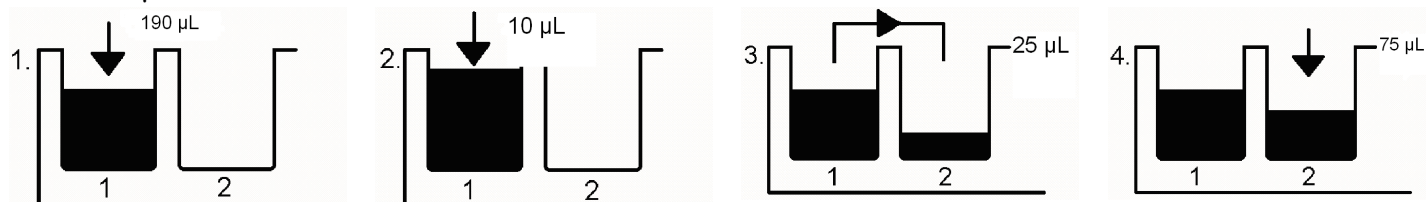
1. Pipettes de précision en parfait état pour dispenser 10, 25, 75 et 190 microlitres.
2. Microplaques de puits rigides avec puits en "U".
3. Système de lecture de microplaque et/ou processeur automatique (option). Tous les instruments ainsi que le logiciel d'interprétation doivent être validés avant 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 μ L de Diluant dans le Puits 1.
2. Ajouter 10 μ 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 μ L dans le Puits 2.
4. Ajouter 75 μ L de Cellules Test parfaitement remises en suspension dans les puits contenant 25 μ 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 tréponèmes⁸, c'est à dire le pian⁷. 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^{6,7,9,10}.
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^{11,12,13}. En cas d'infections par la syphilis latentes/traitées, les taux d'anticorps peuvent être inférieurs à la limite de détection du dosage MICROSYPH™ TPHA1000 et donc fournir un résultat négatif. 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.

REFERENCES

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 serodiagnosis 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.
14. US Department of Human Health Services "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5th Edition, Washington, DC: US Government Printing office, January 2007.

SYMBOLS



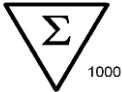
Pour dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Numéro catalogue



Lot



Volume pour 1000 tests



Attention : consulter les documents d'accompagnement



Utiliser avant



Conserver à 2-8°C



Témoin positif



Témoin négatif



Test Cells



Diluant



Numéro d'article commercial global



Constructeur



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

Website: www.axis-shield.com



EC Authorized Representative:

Medical Device Safety Service GmbH (MDSS)

Schiffgraben 41,
30175 Hannover,
Germany

Tel.: + (49) 511 6262 8630

Fax: + (49) 511 6262 8633