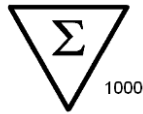




MICROSYPH™ TPHA1000

IVD

REF **FTPHA1000**



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
Web: www.axis-shield.com

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 treponemici¹. 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 TPI⁶ ed una sensibilità comparabile a quella del FTA-ABS⁷. 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)²⁻⁵. 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

TEST CELLS	2 × 40mL	<p>Emazie aviarie conservate, rivestite con antigene di <i>T. pallidum</i> sonicato in tampone.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Le emazie test vanno risospese completamente prima dell'uso. <input type="checkbox"/> Le emazie test sedimentano durante la conservazione. <input type="checkbox"/> È importante che le emazie sedimentate siano coperte dal tampone durante la conservazione a 2-8°C.
DIL	1 × 250mL	<p>Tampone contenente colorante blu. Contiene 0,1% di sodio azide come preservante.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Pronto per l'uso.
CONTROL +	1 × 0,5mL	<p>Defibrinato plasma sifilitico umano umano contenente anticorpi anti-<i>T. pallidum</i>. Il plasma 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.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Diluire prima dell'uso.
CONTROL -	1 × 0,5mL	<p>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.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Diluire prima dell'uso.

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 diluente i campioni e i controlli reattivo e non reattivo. Il diluente 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 o plasma 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. Dipartimento della Sanità e dei Servizi Sociali degli Stati Uniti (US Department of Human Health Services) "Biosicurezza nei laboratori di microbiologia e analisi biomediche" ("*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*"), 5° edizione, Washington, DC: Tipografia di Stato degli Stati Uniti, gennaio 2007,¹⁴ descrive come questi materiali dovrebbero essere trattati nel rispetto della buona pratica di laboratorio.
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.

Diluente	EUH032	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
Controllo Negativo		

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 contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Axis-Shield Diagnostics.

PREPARAZIONE

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

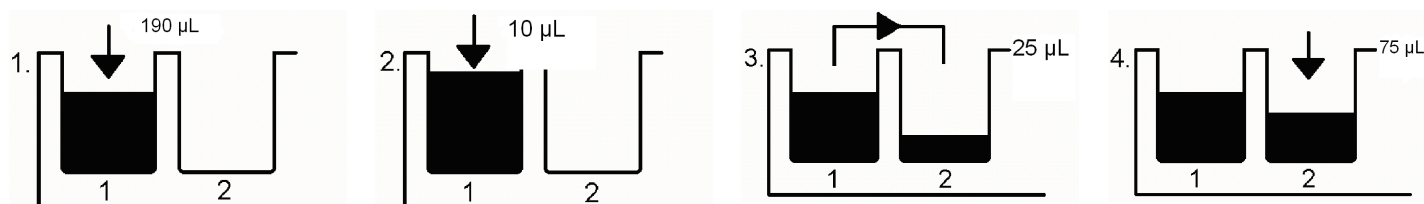
1. Pipette accurate e pulite correttamente, capaci di dispensare 10, 25, 75 e 190 microlitri.
2. Micropiastre rigide con pozzetti a U.
3. Sistema di lettura per micropiastre e/o processori automatizzati (opzionali). Gli strumenti ed il software di interpretazione devono essere convalidati prima dell'uso 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 μL di diluente nel pozzetto 1.
2. Aggiungere 10 μL 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 μL nel pozzetto 2.
4. Aggiungere 75 μL di emazie test risospese nei pozzetti contenenti 25 μL 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 **Limiti D'impiego**). 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 patogena⁸, ad es. framboesia⁷, 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^{6,7,9,10}.
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^{11,12,13}. In infezione da sifilide latenti/trattate i livelli di anticorpi possono scendere al di sotto del limite di rilevamento del dosaggio MICROSYPH™ TPHA1000 e pertanto può dare un risultato negativo. 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.

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 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



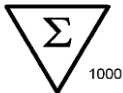
Per dispositivo medico-diagnostico *in vitro*



Numero di catalogo



Lotto



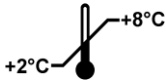
Sufficiente per 1.000 test



Attenzione: consultare la documentazione allegata



Scadenza



Conservare a 2-8°C



Controllo Positivo



Controllo Negativo



Emazie test



Diluente



Numero GTIN



Costruttore



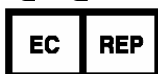
Axis-Shield Diagnostics Limited

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

Ver 2019/09