

1. Utilisation prévue

Il s'agit de la détection qualitative des anticorps IgG et IgM de *Treponema pallidum* associés à la syphilis dans le sérum humain ou le plasma EDTA et de la détermination du niveau de titre des échantillons. La population visée est celle des patients susceptibles, ou présentant un risque élevé, d'être infectés par la syphilis, qui fréquentent les centres de traitement des IST ou d'autres établissements de santé. Ce test n'est pas destiné à une utilisation automatisée. Il n'est pas prévu qu'il serve au dépistage sanguin ou comme test de confirmation exécuté sur des échantillons de donneurs.

2. Principe d'analyse

La syphilis, généralement contractée par contact sexuel, bien qu'elle puisse l'être par transfusion de sang infecté, est causée par le spirochète *Treponema pallidum*. L'infection intra-utérine est également possible. L'infection est une maladie chronique qui évolue généralement en fonction de stades d'infection primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire distincts. Ces stades donnent lieu à des symptômes cliniques divers, produisant généralement des lésions initiales appelées chancres, puis une éruption syphilitique suivie de longues périodes de dormance. Une infection non traitée peut éventuellement entraîner des problèmes cardiovasculaires et une neurosyphilis.

L'organisme ne peut pas être cultivé de façon routinière dans des milieux artificiels, et le diagnostic de l'infection dépend généralement de la mise en évidence, dans le sang, d'anticorps qui apparaissent peu après l'infection initiale.

NewBio TPHA utilise des érythrocytes aviaires conservés, recouverts d'antigènes extraits de *T. pallidum* (souche Nichols). Les anticorps spécifiques présents dans un échantillon de plasma ou de sérum se lient à ces antigènes lorsque l'échantillon est incubé avec les érythrocytes. Cela provoque l'agglutination des érythrocytes, qui se déposent ensuite pour former un motif caractéristique dans le tube à essai. Les réactions non spécifiques sont éliminées par l'utilisation d'absorbants.

3. Composants

Nom	Description	100 tests NB007	200 tests NB008	1000 tests NB009
Cellules tests	Érythrocytes aviaires recouverts d'antigènes à <i>T. pallidum</i>	8,5 mL	2 x 8,5 mL	2 x 40 mL
Cellules témoins	Érythrocytes aviaires	8,5 mL	2 x 8,5 mL	1 x 40 mL
Diluant pour échantillon	Solution saline contenant des absorbants	20 mL	2 x 20 mL	4 x 50 mL
Témoin positif	Antisérum de lapin Titre 1/1280	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Témoin négatif	Sérum de lapin normal	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Instructions d'utilisation				

4. Matériel supplémentaire requis

Micropipettes capables de délivrer : 10, 25, 75 et 190 µL

Microplaques à 96 tubes en U

5. Préparation du réactif

Amener tous les réactifs et échantillons à température ambiante avant utilisation.
Des kits témoins doivent être utilisés pour chaque analyse.
S'assurer que les cellules tests et témoins soient bien remises en suspension.

6. Stockage et durée de conservation après la première ouverture

1. Les cellules tests et les cellules témoins doivent être conservées en position verticale à 2-8 °C. Ne pas congeler.
2. Après ouverture, les cellules tests, les cellules témoins, le diluant pour échantillon et les témoins sont stables jusqu'à 3 mois lorsqu'ils sont stockés verticalement entre 2 et 8 °C.
3. Ne pas utiliser après la date d'expiration.

7. Mises en garde et précautions

1. NewBio TPHA est destiné à un usage de diagnostic in vitro uniquement - un usage professionnel uniquement.
2. Les cellules tests, les cellules témoins, le diluant et les témoins pour échantillon contiennent, comme agent de conservation, de l'azide de sodium (< 0,1 % p/v) qui peut s'accumuler dans les tuyaux en plomb ou en cuivre et former des azides potentiellement explosifs. Pour éviter l'accumulation d'azide, il faut rincer avec de grands volumes d'eau après avoir jeté des solutions contenant de l'azide dans les canalisations.
3. Les réactifs et les témoins contiennent des matières d'origine animale. L'albumine bovine utilisée dans la fabrication de ce produit provient d'animaux donateurs qui ont été inspectés et certifiés exempts de maladie par les inspecteurs des Services vétérinaires.
4. Ne pas congeler les cellules tests, les cellules témoins, le diluant pour échantillon et les témoins.
5. Les cellules tests et les cellules témoins doivent être soigneusement remises en suspension avant d'être utilisées. Le non-respect de cette consigne peut entraîner une dilution inadéquate et des résultats erronés.
6. Les érythrocytes des cellules tests et des cellules témoins doivent être recouverts par le milieu de suspension pendant le stockage. Si ce n'est pas le cas, les érythrocytes doivent être remis en suspension, faute de quoi ils risquent de s'agglutiner dans le tube à essai.
7. Les cellules tests, les cellules témoins et le diluant pour échantillon provenant du même lot peuvent être regroupés selon les bonnes pratiques de laboratoire.
8. Les réactifs présentant des signes visibles de croissance microbienne ou une turbidité importante peuvent indiquer une dégradation et doivent être éliminés conformément aux règles locales.
9. Les effets de la contamination microbienne dans les spécimens ne peuvent être prédits.
10. Ne pas utiliser les cellules tests, les cellules témoins, le diluant pour échantillon ou les témoins après la date de péremption.
11. Ne pas intervertir les bouchons des flacons témoins positifs et négatifs. Les témoins sont différenciés par des bouchons à code couleur et par l'étiquette du flacon. Si les bouchons sont intervertis par inadvertance, les tubes témoins doivent être jetés.
12. Les échantillons présentant une lipémie importante, une hémolyse ou un ictère peuvent être compromis et nécessiter d'autres tests.
13. Tout écart par rapport aux instructions d'utilisation du TPHA de NewBio peut fausser les résultats.
14. Éliminer les restes de réactifs de manière sûre, conformément à la réglementation locale.

8. Collecte, manipulation et stockage des échantillons

NewBio TPHA peut être utilisé pour des tests réalisés avec des échantillons de sérum humain ou de plasma EDTA jusqu'à 7 jours après le prélèvement. Les échantillons doivent être exempts de particules pour éviter toute interférence avec le résultat du test. Si des érythrocytes ou d'autres composants visibles sont présents dans l'échantillon, les éliminer par centrifugation pour éviter toute interférence avec les résultats du test. Conserver les échantillons de plasma et de sérum EDTA à 2-8 °C jusqu'à 7 jours. Les échantillons de plasma et de sérum EDTA peuvent être congelés à moins de -20 °C pendant un mois maximum, puis décongelés et mélangés soigneusement avant le test. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 5 fois.

Laisser tous les échantillons s'équilibrer à température ambiante avant de les utiliser.

9. Procédure de test

Chaque échantillon nécessite 3 tubes plus 2 tubes supplémentaires pour les témoins positifs et négatifs.

Remarque : Pour NewBio TPHA 1000, n'utiliser que des cellules témoins lors d'un nouveau test.

1. Dilution d'échantillon (jusqu'à 1 pour 20)

Ajouter 190 µL de diluant pour échantillon dans le premier tube.

Ajouter 10 µL d'échantillon dans le même tube.

Mélanger soigneusement.

Remarque : les témoins du kit sont pré-dilués (c'est-à-dire dilués à 1 pour 20).

2. Test

Ajouter 25µL de témoin positif et de témoin négatif dans les tubes désignés.

Transférer 25 µL d'échantillon dilué de l'étape 1 dans un tube.

Transférer 25 µL d'échantillon dilué de l'étape 1 dans un tube témoin.

Bien remettre en suspension les cellules tests et témoins.

Ajouter 75 µL de cellules tests aux tubes témoins positifs et aux tubes témoins négatifs.

Pour les échantillons dilués, ajoutez 75 µL de cellules tests aux tubes test, et 75 µL de cellules témoins aux tubes témoins.

(La dilution finale de l'échantillon ou du témoin est de 1 pour 80)

Bien secouer les tubes.

Incuber à 15-30 °C sur une surface sans vibration pendant 45-60 minutes.

Lire les modèles d'agglutination. Les modèles sont stables s'ils ne sont pas perturbés.

Procédure de test de titrage de l'échantillon (facultatif)

9 tubes sont nécessaires pour chaque échantillon d'une dilution de 1 pour 80 à 1 pour 10 240.

2 tubes supplémentaires sont nécessaires pour les témoins positifs et négatifs si exécutés à 1 pour 80 uniquement).

1 tube supplémentaire est nécessaire si des cellules témoins sont utilisées.

1. Dilution d'échantillon (à 1 pour 20)

Ajouter 190 µL de diluant pour échantillon dans le premier tube.

Ajouter 10 µL de l'échantillon dans le même tube.

Mélanger soigneusement.

Remarque : les kits témoins sont pré-dilués (c'est-à-dire dilués à 1 pour 20).

2. Titration

Laisser les deuxième et troisième tubes vides, ajouter 25µL de diluant du tube 4 au tube 10 dans l'ordre.

Transférer 25 µL de l'étape 1 vers les deuxième et troisième tubes.

Transférer 25 µL de l'étape 1 au quatrième tube et mélanger, puis diluer en série dans l'ordre de la suite des tubes, jeter l'excès de 25 µL du dernier tube.

Remarque : il faut veiller à éviter le transfert d'échantillon entre les étapes de dilution en série.

Le témoin positif du kit peut être titré si nécessaire.

3. Test

Bien remettre en suspension les cellules tests et les cellules témoins

Ajouter 75 µL de cellules témoins dans le tube n° 2.

Ajouter 75 µL de cellules tests dans les tubes n° 3 à n° 10.

(La dilution finale de l'échantillon pour les cellules tests est de 1 pour 80 - 1 pour 10 240).

Bien secouer les tubes.

Laisser incuber à 15-30 °C sur une surface sans vibration pendant 45-60 minutes.
 Lire les modèles d'agglutination. Les modèles sont stables s'ils ne sont pas perturbés.
 Le titre de l'échantillon est l'inverse de la dilution de l'échantillon positif final.

10. Procédure témoin

Les témoins positifs et négatifs doivent être analysés pour chaque test. Si nécessaire, le kit positif peut être titré, et le point final attendu est 1/640 - 1/2 560. Des tests CQ supplémentaires peuvent être effectués par l'opérateur en incluant d'autres spécimens caractérisés ou du matériel de référence.

Le témoin positif doit produire un résultat positif et le témoin négatif doit produire un résultat négatif pour le test. Si des résultats appropriés ne sont pas obtenus avec les témoins, l'analyse est considérée comme invalide et tous les échantillons de cette analyse doivent être retestés.

Les témoins TPHA sont pré-dilués. Ils doivent être ajoutés directement dans le tube de réaction sans être dilués dans le diluant pour échantillon de TPHA. Les cellules tests sont ajoutées directement aux témoins.

11. Interprétation des résultats

Un échantillon dans lequel les cellules tests ne sont pas réactives sera considéré comme **négatif aux anticorps du *T. pallidum***.

Une réactivité inférieure à la notation « équivoque » sera considérée comme négative.

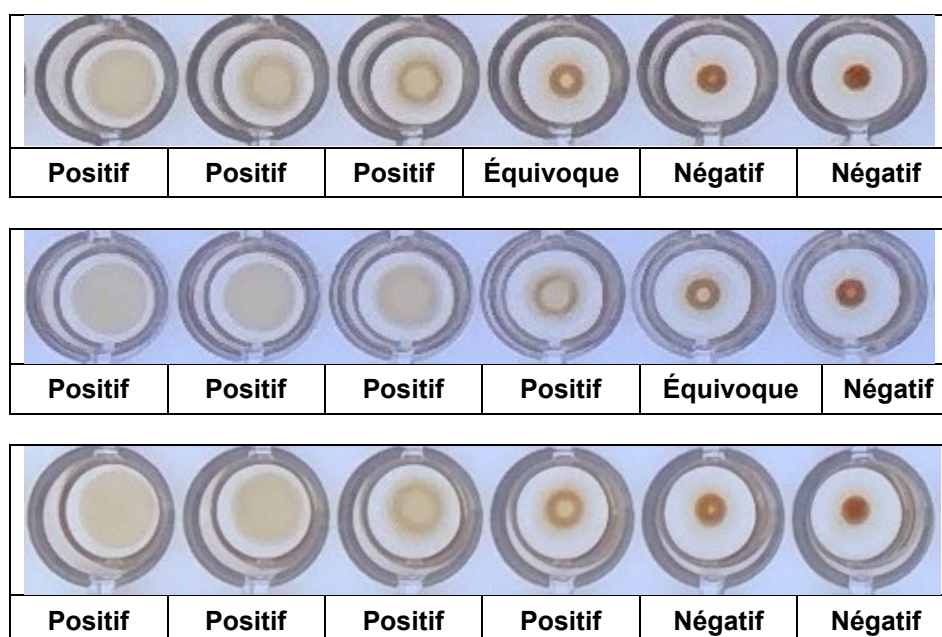
Un échantillon dans lequel le tube des cellules tests est réactif ou équivoque indique la présence d'anticorps du *T. pallidum* résultant d'une infection syphilitique. L'échantillon devra être renouvelé en double. Si l'un des résultats du renouvellement en double est réactif ou équivoque, l'échantillon devra être considéré comme **positif aux anticorps du *T. pallidum***. Si les deux résultats de renouvellement en double sont non réactifs, alors les échantillons seront déterminés comme non réactifs.

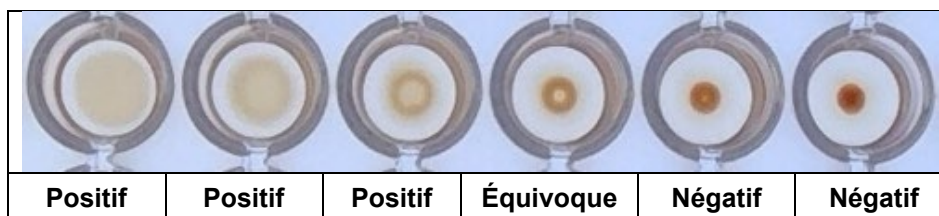
Si un échantillon est réactif à la fois pour les cellules tests et témoins, si l'agglutination est plus importante parmi les cellules tests alors l'échantillon sera considéré comme positif et la manipulation devra être répétée comme ci-dessus.

Lors de l'exécution de la procédure de titrage d'échantillon, un titre $\geq 1/80$ sera considéré comme réactif et l'échantillon devra être renouvelé en double.

Des résultats réactifs peuvent indiquer des infections syphilitiques actives, passées ou traitées avec succès.

Des exemples d'interprétation de résultats sont indiqués dans la figure ci-dessous.





Cellules tests	Cellules témoins	Répéter	Absorption	Interprétation
+ (fort)	+ (faible)	O	N	TP positif
+ (égal à CC)	+ (égal à TC)	O	Y	TP positif
+ (faible)	+ (fort)	O	Y	TP positif
+	-	O	N	TP positif
-	-	N	N	TP négatif
-	+	O	N	TP négatif

Absorption de réactions non spécifiques (à réaliser uniquement lorsqu'un échantillon présente une agglutination plus importante, ou égale, dans les cellules témoins que dans les cellules tests)

1. Ajouter 10 µL d'échantillon à 190 µL de cellules témoins remises en suspension, bien mélanger et laisser reposer 30 minutes.
2. Centrifuger de façon à obtenir un dépôt de cellules d'un minimum de 1 500 g pendant 3 minutes.
3. Prélever 25 µL du produit qui surnage à l'étape 2 pour les ajouter dans chacun des 2 tubes.
4. S'assurer que les cellules tests et témoins soient remises en suspension.
Ajouter 75 µL de cellules tests dans le premier tube.
Ajouter 75 µL de cellules témoins dans le second tube.
5. Bien secouer les tubes et faire incuber à 15-30 °C sur une surface sans vibration pendant 45-60 minutes.
6. Lire et interpréter les modèles comme ci-dessus.

Pendant la période d'absorption de réactions non spécifiques, la couche de produit qui surnage est ajoutée directement au tube de réaction sans diluer dans le diluant d'échantillon. L'exécution incorrecte de cette étape peut entraîner de faux résultats négatifs.

12. Caractéristiques de performance

Limite de détection

Le TPHA a une durée limite de détection $\leq 0,1$ IU/mL par comparaison avec le 1er IgG du plasma syphilitique humain à une IS reconnue par l'OMS (code NIBSC : 05/122).

Reproductibilité

La reproductibilité du test a été évaluée à l'aide d'un panel caractérisé de titres mixtes comprenant 25 échantillons positifs et 5 échantillons négatifs à la syphilis. Le panel a été testé en utilisant plusieurs lots de TPHA de NewBio sur 5 jours de test sur une période de 7 jours, en double, avec deux passages séparés pour chaque jour de test.

Étude de reproductibilité – taux de concordance

Échantillons	Concordance : N=	Total : N=	Taux de concordance	95% CI
Positif à la syphilis	250	250	100,00 %	98,54 – 100 %
Négatif à la syphilis	50	50	100,00%	92,89 – 100 %
Ensemble	300	300	100,00%	98,78 – 100 %

Réactivité croisée et interférence

140 échantillons négatifs à la syphilis contenant des anticorps aux maladies infectieuses (rubéole, toxoplasmose, borrelia, EBV, HCV, HBV, HAV, HIV, HTLV, herpès, chlamydiae), des anticorps ANA, des anticorps au facteur rhumatoïde et des échantillons provenant de femmes enceintes (multipares) ont été testés avec NewBio TPHA. Tous les échantillons ont donné le résultat négatif attendu.

151 échantillons positifs à la syphilis contenant ces anticorps et des échantillons provenant de femmes enceintes (multipares) ont été testés avec NewBio TPHA. Tous les échantillons ont donné le résultat positif attendu.

Prozone

Des effets prozone peuvent être observés à des niveaux d'anticorps très élevés pour les tests d'hémagglutination. Dans les études portant sur NewBio TPHA, aucun résultat négatif n'a été obtenu à des niveaux élevés d'anticorps au TP allant jusqu'à 100 UI/mL.

Sensibilité diagnostique

Un panel de 205 échantillons positifs à la syphilis obtenus commercialement et bien caractérisés (157 sérums et 48 plasmas EDTA) a été testé en utilisant NewBio TPHA par comparaison avec NewBio TPHA PK 2000. Le véritable statut clinique des échantillons positifs à la syphilis obtenus commercialement a été présumé être celui défini par les résultats du test du vendeur.

Test initial TPHA de NewBio par comparaison avec TPHA PK 2000

Échantillon	Mesure de concordance	Concordance : N =	Total : N =	ROA	95 % CI
Sérum	PPA	157	157	100,0 %	97,68-100,0 %
Plasma EDTA	PPA	48	48	100,0 %	92,60-100,0 %
Combiné	PPA	205	205	100,0 %	98,22-100,0 %

Résumé statistique par comparaison avec le statut clinique

Échantillon	Mesure de concordance	Concordance : N =	Total : N =	ROA	95 % CI
Tous les échantillons	Sensibilité	205	205	100,0 %	98,22-100,0 %

Spécificité du diagnostic

Un panel de 1 248 échantillons de plasma EDTA connus pour être négatifs au TP a été testé en utilisant NewBio TPHA par comparaison avec le TPHA PK 2000 de NewBio. Les échantillons initialement réactifs ont été retestés en double avec la méthode correspondante.

Test initial – TPHA de NewBio par comparaison avec TPHA PK 2000

Échantillon	Mesure de concordance	Concordance : N =	Total : N =	ROA (%)	95% CI (%)
Plasma EDTA	NPA	1 236	1 238	99,84	99,42-99,98

Analyse répétée du TPHA de NewBio par comparaison avec TPHA PK 2000

Échantillon	Mesure de concordance	Concordance : N =	Total : N =	ROA	95 % CI
Plasma EDTA	NPA	1 245	1 246	99,92	99,55-100,0

Résumé statistique par type d'échantillon par comparaison avec le statut clinique — après analyse renouvelée











Échantillon	Mesure de concordance	Concordance : N =	Total : N =	ROA	95 % CI
Plasma EDTA	Spécificité	1 247	1 248	99,92	99,55-100,0

13. Limitations

NewBio TPHA peut être utilisé pour les échantillons de sérum et de plasma EDTA. Aucune substance interférente n'a été identifiée, mais le TPHA peut réagir à d'autres infections tréponémiques telles que T. pertenue et T. carateum. Les résultats positifs doivent donc être confirmés par une autre méthode.

Dans le cas d'une syphilis primaire précoce, il arrive que des anticorps spécifiques ne soient pas détectés.

14. Symboles

	Référence catalogue
	Dispositif médical de diagnostic in vitro (DIV)
	Fabriqué par
	Représentant autorisé UE
	Importateur UE
	Distributeur
	Limite de température
	Utiliser avant
	Code de lot
	Consulter les instructions d'utilisation

15. Surveillance post-marché

Si ce diagnostic in vitro (DIV) est impliqué dans un incident grave, un rapport, dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est identifié, doit être adressé au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre.



www.new-bio.com

info@new-bio.com

16. Résumé de la sécurité et de la performance

Vous trouverez un résumé de la sécurité et de la performance à l'adresse du site EUDAMED

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.

17. Références documentaires

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. Wasley G.D. & Wong H.H.Y. Syphilis Serology Principles and Practice. Oxford Medical Publications 104 – 105



Pour des instructions dans d'autres langues, veuillez consulter notre site web

<http://www.new-bio.com>

ou contacter votre distributeur. D'autres langues sont disponibles sur demande.