



TPHA-DAT

REF 26035

DIESSE Diagnostica
Senese S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





ISTRUZIONI PER L'USO

TPHA-DAT

Test per la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi diretti verso il *Treponema pallidum* in siero umano tramite emoagglutinazione passiva applicabile allo strumento AUTO-DAT.

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Test per la determinazione semi-quantitativa degli anticorpi diretti verso il *Treponema pallidum* in siero umano tramite emoagglutinazione passiva.

2. INTRODUZIONE

La Sifilide è un'infezione cronica che evolve in stadi distinti di infezione primaria, secondaria, latente e terziaria. Questi stadi determinano diversi sintomi clinici, producendo generalmente una lesione iniziale conosciuta come sifiloma che evolve poi in eruzione sifilitica seguita da lunghi periodi di latenza. Se non trattata l'infezione può causare problemi cardiovascolari e neurosifilide.

L'infezione è causata da un batterio dell'ordine delle spirochete, il *Treponema pallidum*, e si contrae generalmente tramite rapporti sessuali, sebbene la malattia possa essere trasmessa anche a seguito di trasfusioni di sangue infetto. Sono anche possibili infezioni intrauterine.

La diagnosi di infezione si basa sull'utilizzo di quattro categorie di test: esame microscopico diretto, ricerca antigene diretto, ricerca anticorpi non treponemici, ricerca anticorpi treponemici.

Il TPHA è un test che determina anticorpi specifici anti-treponema largamente utilizzato per lo screening della sifilide.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Gli anticorpi specifici nel siero del paziente si legano agli antigeni treponemici (ceppo Nichols) adesi a eritrociti aviari. La reazione è positiva in caso di agglutinazione delle cellule. Se le cellule vanno a formare un bottone compatto la reazione è negativa.

I risultati vengono stampati dallo strumento AUTO-DAT. In ogni caso è possibile effettuare la stima del titolo visivamente.

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi per la ricerca di HBsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una

completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine biologica deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni ed i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova.
3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test
4. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Schede di Sicurezza (disponibile su richiesta).
5. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata.

Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti.

Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C).

1. Dopo l'uso riporre i reagenti a 2-8°C.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
3. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
4. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti.
5. Non prolungare l'incubazione oltre le 24 ore
6. Non utilizzare campioni emolizzati, lipemici, itterici, di siero non completamente coagulato o di campioni che presentano inquinamento microbico.

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono sufficienti per 50 determinazioni.

TEST CELLS CELLULE TEST 2 x 4 mL

Contenuto: eritrociti aviari sensibilizzati con antigene di *Treponema pallidum*.

CONTROL CELLS CELLULE DI CONTROLLO 1 x 4 mL

Contenuto: eritrociti aviari non sensibilizzati.

SAMPLE DILUENT DILUENTE CAMPIONI 1 x 10 mL

Contenuto: soluzione salina contenente sostanze inibenti reazioni aspecifiche.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.3 mL

Contenuto: siero umano diluito contenente anticorpi anti-Treponema pallidum. Pronto all'uso.

CONTROL - CONTROLLO NEGATIVO 1 x 0.3 mL

Contenuto: siero umano diluito non contenente anticorpi anti-Treponema pallidum. Pronto all'uso.

3 Micropiastre da 96 pozzetti con fondo a U

PORTARE I REAGENTI A TEMPERATURA AMBIENTE PRIMA DELL'USO**ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO:**

- Pipette con puntali disposable
- Strumento AUTO-DAT (REF 26000)

6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

Non congelare. Conservare i flaconi in posizione verticale.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

Se conservati ed utilizzati secondo le istruzioni, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Siero fresco conservato a 2-8°C fino ad un massimo di 4 giorni. Per conservazioni più lunghe congelare a -20°.

Si possono effettuare due scongelamenti/ricongelamenti successivi.

I campioni scongelati devono essere ben mescolati prima del test. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.

8. PROCEDIMENTO

Per eseguire il test con lo strumento AUTO-DAT seguire le indicazioni riportate nel relativo Manuale Utente.

8.1 Dosaggio AUTO-DAT

Range di dosaggio: lo strumento esprime risultati da negativo (NEG) a $\geq 1/2560$. La valutazione avviene osservando l'agglutinazione del campione alle diluizioni 1/80 e 1/640.

Per effettuare la diluizione 1/80 dei campioni utilizzare i pozzetti delle righe A ed E.

- Aggiungere al pozzetto A1 ed al pozzetto E1 95 µl di diluente e successivamente 5 µl del primo e del secondo campione rispettivamente.
- Mescolare accuratamente.
- Prelevare 25 µl di soluzione in A1 e trasferirli nel pozzetto B1

- Prelevare 25 µl di soluzione in A1 e trasferirli nel pozzetto C1
- Prelevare 25 µl di soluzione in E1 e trasferirli nel pozzetto F1
- Prelevare 25 µl di soluzione in E1 e trasferirli nel pozzetto G1
- Risospendere accuratamente per inversione le Cellule Test e le Cellule di Controllo.
- Aggiungere 75 µl di Cellule di Controllo nei pozzetti B1 e F1
- Aggiungere 75 µl di Cellule Test nei pozzetti C1 e G1

Per effettuare la diluizione 1/640 dei campioni, utilizzare i pozzetti delle righe D ed H.

- Prelevare 3.5 µl delle soluzioni in A1 ed E1, aggiungendoli a 25 µl di diluente.
- Mescolare accuratamente e scartare 3.5 µl di soluzione
- Aggiungere 75 µl di Cellule Test in ciascun pozzetto

	1	2
A	Campione 1 5 µl + 95 µl diluente	Controllo positivo
B	25 µl soluzione A1 + 75 µl di Cellule di Controllo	25 µl Controllo positivo + 75 µl di Cellule di Controllo
C	25 µl soluzione A1 + 75 µl di Cellule Test	25 µl Controllo positivo + 75 µl di Cellule Test
D	3.5 µl soluzione A1 + 25 µl diluente + 75 µl di Cellule Test	25 µl Controllo positivo + 75 µl di Cellule Test
E	Campione 2 5 µl + 95 µl diluente	Controllo negativo
F	25 µl soluzione E1 + 75 µl di Cellule di Controllo	25 µl Controllo negativo + 75 µl di Cellule di Controllo
G	25 µl soluzione E1 + 75 µl di Cellule Test	25 µl Controllo negativo + 75 µl di Cellule Test
H	3.5 µl soluzione E1 + 25 µl diluente + 75 µl di Cellule Test	25 µl Controllo negativo + 75 µl di Cellule Test

Ripetere l'operazione per tutte le coppie successive di campioni utilizzando le colonne della piastra da 2 a 12.

Una volta effettuate le diluizioni ed aggiunti tutti i reattivi:

- Mescolare accuratamente evitando la formazione di bolle.
- Porre la piastra all'interno dello strumento AUTO-DAT per effettuare l'incubazione di 60 minuti e la successiva lettura.

Nota: i controlli positivi e negativi vengono forniti pronti all'uso e non richiedono diluizione.

I controlli positivi e negativi devono essere utilizzati seguendo lo schema dei campioni; si impiegano 4 pozzetti per il controllo positivo e 4 pozzetti per quello negativo.

Il primo pozzetto è lasciato vuoto (fila A e E) e nel 3° e 4° si esegue il controllo con le cellule test in doppio.

L'incubazione del test si può effettuare sul banco se lo strumento è occupato o se devono essere effettuate più di 24 campioni.

In tal caso, inserire la piastra nello strumento AUTO-DAT con la massima cautela, evitando urti accidentali.

In caso di non utilizzabilità dello strumento AUTO-DAT, il test può essere effettuato in modalità manuale con diluizione a raddoppio e lettura visiva del risultato.

In questo caso seguire il procedimento descritto al paragrafo 8.2.

8.2 Dosaggio in modalità manuale

Per effettuare la diluizione dei campioni utilizzare i pozzetti delle righe A ed E.

Il test si effettua utilizzando i pozzetti di una colonna della piastra.

I pozzetti della fila A sono impiegati per la diluizione del campione, quelli della fila B per effettuare il test con le Cellule di Controllo.

- Diluire il campione nel pozzetto A1 come al punto 8.1
- Lasciare vuoti sia il pozzetto B1 che C1.
- Aggiungere 25 µl di sample diluent a tutti i successivi pozzetti della colonna 1.
- Dispensare 25 µl di campione nel secondo, terzo e quarto pozzetto. Da quest'ultimo effettuare diluizione a raddoppio, fino all'ottavo pozzetto. Scartare da quest'ultimo 25 µl.
- Aggiungere 75 µl di Cellule di Controllo al pozzetto 2 e 75 µl di Cellule Test a tutti gli altri.

Il titolo del campione può variare da 1/80 a 1/2560.

	1
A	Campione 1 5 µl + 95 µl diluente
B	25 µl di campione A1 + 75 µl di Cellule di Controllo
C	25 µl di campione A1 + 75 µl di Cellule Test
D	25 µl diluente + 25 µl di campione A1 + 75 µl di Cellule Test
E	25 µl diluente + 25 µl di campione D1 + 75 µl di Cellule Test
F	25 µl diluente + 25 µl di campione E1 + 75 µl di Cellule Test
G	25 µl diluente + 25 µl di campione F1 + 75 µl di Cellule Test
H	25 µl diluente + 25 µl di campione G1; scartare 25 µl di soluzione; aggiungere 75 µl di Cellule Test

- Attendere 60 minuti su un banco privo di vibrazioni ed osservare la formazione di agglutinato o bottone compatto di eritrociti.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Effettuare il test con il controllo positivo e negativo.

Se il risultato è diverso dall'atteso, contattare il Scientific Support:

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

In assenza di agglutinazione gli eritrociti sedimentano, formando un bottone compatto al centro del pozzetto.

In caso di agglutinazione gli eritrociti sedimentano, formando uno strato omogeneamente diffuso sul fondo del pozzetto e/o formando una caratteristica struttura ad anello.

L'agglutinazione delle Cellule Test e la contemporanea assenza di agglutinazione delle Cellule di controllo è indice della presenza di anticorpi anti-Treponema pallidum.

L'assenza di agglutinazione indica che gli anticorpi, se presenti, sono ad una concentrazione inferiore al limite di sensibilità del test.

Le Cellule di Controllo sedimentano formando un bottone particolarmente compatto; nel caso si verifichi la loro agglutinazione, il test non è da considerarsi valido.

Il titolo semi-quantitativo è dato dall'ultima diluizione capace di dare agglutinazione.

La presenza di un bottone compatto di eritrociti sedimentato sul fondo viene interpretata come risultato negativo.

Il titolo 1/80 è considerato il limite fra campioni non reattivi e reattivi.

11. LIMITAZIONI DEL TEST

Gli anticorpi rivelati dal TPHA si formano dopo 4-5 settimane dall'inizio della malattia.

Nessun test in emoagglutinazione su siero è in grado di distinguere gli anticorpi derivanti da infezioni causate da *Treponema pallidum* da quelli derivanti da infezioni causate da altri treponemi patogeni.

Lebbra lepromatosa e mononucleosi infettiva possono mostrare reazioni falsamente positive con questo tipo di test.

Il risultato ottenuto deve sempre essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

12. SENSIBILITÀ ANALITICA

Sensibilità analitica: 1/80.

13. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 419 campioni.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	207	0	207
	-	3	209	212
	Totale	210	209	419

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):

98.6% CI_{95%}: 95.9.-99.5

Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica):

100% CI_{95%}: 98.2-100

Il grado di concordanza tra i due metodi risulta essere ottimo con un valore di K (Coefficiente di Cohen) di 0.98.

14. BIBLIOGRAFIA

- Lesiński J., Krach J. and Kadziewicz E. Specificity, sensitivity and diagnostic value of the TPHA test. British Journal of Venereal Diseases (1974) 50,334.
- Rathlev T. Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the sero-diagnosis of Syphilis. British Journal of Venereal Diseases (1967), 43, 181.
- Uete T., Fukazawa S., Ogi K. and Takeuchi Y. Clinical evaluation of *T. pallidum* haemagglutination test. British Journal of Venereal Diseases (1971) 47, 73.
- Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol (2005); 16(1):45-51.
- Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. WHO (2013).



INSTRUCTIONS FOR USE

TPHA-DAT

Test for the semiquantitative determination of antibodies against *Treponema pallidum* in human serum, by passive haemoagglutination, applied to AUTO-DAT instrument.

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Test, by passive haemoagglutination, for the semiquantitative determination of antibodies against *Treponema pallidum* in human serum.

2. INTRODUCTION

Syphilis is a chronic infection that evolves into distinct stages of primary, secondary, latent and tertiary infection. These stages determine different clinical symptoms, generally producing an initial lesion known as syphiloma, which then evolves into a syphilitic eruption followed by long latency periods. If left untreated, the infection can cause cardiovascular problems and neurosyphilis.

The infection is caused by a bacterium of the spirochetes order, *Treponema pallidum*; it is, generally, sexually transmitted, although the disease can also be transmitted by infected blood transfusions. Intrauterine infections are also possible.

The diagnosis is based on the use of four test categories: direct microscopic examination, direct antigen test, non-treponemic antibody test and treponemic antibody test. TPHA test, which determines the presence of specific anti-treponemic antibodies, is widely used for the screening of syphilis.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The specific antibodies, present in serum of the patient, bind to the treponemic antigens (Nichols strain), coated to avian erythrocytes.

In case of cell agglutination, the reaction is positive. If the cells form a compact button, the reaction is negative.

The results are printed by the Auto-DAT instrument. In any case the titer can be estimated visually.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response for the presence of HBsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as

potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling reagents and samples

Waste disposal: samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay.
3. Wash hands thoroughly when finished.
4. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
5. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical Precautions

Bring the device to room temperature (18-30°C) before use.

1. After use, and return reagents to 2-8°C.
2. Do not use the reagents after the expiry date.
3. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
4. Do not modify the Test Procedure. Do not substitute reagents using reagents from other suppliers or other lots, unless it is specifically indicated that the reagent is interchangeable between lots.
5. Do not extend the incubation further than 24 hours.
6. Do not use hemolyzed, lipemic, icteric samples, serum not completely coagulated or samples presenting microbial contamination.

5. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient for 50 determinations.

TEST CELLS TES CELLS 2 x 4 mL

Contents: avian erythrocytes, coated with *Treponema pallidum* antigens.

CONTROL CELLS CONTROL CELLS 1 x 4 mL

Contents: uncoated avian erythrocytes.

SAMPLE DILUENT SAMPLE DILUENT 1 x 10 mL

Contents: saline solution containing substances which inhibit non-specific reactions.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 0.3 ml

Contents: diluted human serum containing anti-Treponema pallidum antibodies. Liquid, ready to use.

CONTROL - NEGATIVE CONTROL 1 x 0.3 mL

Contents: diluted human serum not containing anti-Treponema pallidum antibodies. Liquid, ready to use.

96 U-WELLS MT MICROPLATES: 3

BRING THE REAGENTS TO ROOM TEMPERATURE BEFORE USE.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- Pipettes with disposable tips
- AUTO-DAT instrument (REF 26000)

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

Do not freeze. Keep the vials in vertical position.

The expiry date is printed on each component and on the kit label.

If stored and used according to the Instructions, the reagents are stable up to the expiration date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Fresh serum stored at 2-8°C for a maximum of 4 days. For longer storage, freeze at -20°C.

Two subsequent freezing and thawing can be performed.

Thawed samples must be well mixed before the test.

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers.

8. ASSAY PROCEDURE

Follow the indications reported on the User Manual to perform the test with the AUTO-DAT instrument.

8.1 Assay with AUTO-DAT

Assay range: the instrument expresses the results from negative (NEG) to $\geq 1/2560$. The evaluation is performed by observing the sample agglutination at the dilutions of 1/80 and 1/640.

In order to dilute the samples 1/80, use the wells of rows A and E.

- Add 95 µl of Sample diluent to well A1 and well E1 and then 5 µl of the first and second samples respectively.
- Mix thoroughly.
- Collect 25 µl of solution present in A1 and transfer to well B1.
- Collect 25 µl of solution present in A1 and transfer to well C1.
- Collect 25 µl of solution present in E1 and transfer to well F1.
- Collect 25 µl of solution present in E1 and transfer to well G1.
- Resuspend thoroughly by inversion both the Test Cells and the Control Cells.
- Add 75 µl of Control Cells to wells B1 and F1.

- Add 75 µl of Test Cells to wells C1 and G1.

In order to dilute the samples 1:640, use the wells of rows D and H.

- Collect 3.5 µl of the solutions in A1 and E1, adding them to 25 µl of diluent.
- Mix thoroughly and discard 3.5 µl of solution
- Add 75 µl of Test Cells to each well

	1	2
A	Sample 1 5 µl + 95 µl sample diluent	Positive Control
B	25 µl solution present in A1 + 75 µl Control Cells	25 µl Positive Control + 75 µl Control Cells
C	25 µl solution present in A1 + 75 µl Test Cells	25 µl Positive Control + 75 µl Test Cells
D	3.5 µl solution present in A1 + 25 µl sample diluent + 75 µl Test Cells	25 µl Positive Control + 75 µl Test cells
E	Sample 2 5 µl + 95 µl sample diluent	Negative Control
F	25 µl solution present in E1 + 75 µl Control Cells	25 µl Negative Control + 75 µl Control Cells
G	25 µl solution present in E1 + 75 µl Test Cells	25 µl Negative Control + 75 µl Test Cells
H	3.5 µl solution present in E1 + 25 µl sample diluent + 75 µl Test Cells	25 µl Negative Control + 75 µl Test Cells

Repeat the operation for all the subsequent pairs of samples using the columns of plate from 2 to 12.

Once the dilutions have been prepared and all the reagents added:

- Mix thoroughly avoiding the formation of bubbles.
- Place the plate inside the AUTO-DAT to perform the incubation for 60 minutes and the relative reading.

Note: the positive and negative controls are supplied ready for use and they do not require dilution.

Positive and negative controls should be used following the samples scheme; 4 wells are used for the positive control and 4 wells are used for the negative control.

The first well is left empty (row A and E); in the 3rd and 4th well the test with test cells (in double) is performed.

If the instrument is already in use or if more than 24 samples have to be tested, the incubation can be performed on the lab bench.

In this case, insert the plate into the AUTO-DAT, with high caution, avoiding accidental knocks.

In case the AUTO-DAT instrument cannot be used, the test can be performed in manual mode with a doubling dilution and a visual reading of the result.

In this case follow the procedure described at paragraph 8.2.

8.2 Assay with manual procedure

In order to dilute the samples, use the wells of rows A and E.

The test is carried out using the wells of the plate column.

The wells in row A are used for the dilution of the sample, those in row B are used to perform the test with the Control Cells.

- Dilute the sample in well A1 as described at paragraph 8.1.
- Leave both the wells B1 and C1 empty.
- Add 25 µl of sample diluent to all the subsequent wells in column 1.
- Add 25 µl of sample to the second, third and fourth well. From the latter make a doubling dilution, up to the eighth well. Discard 25 µl from this last one.
- Add 75 µl of Control Cells to well 2 and 75 µl of Test Cells to all the others.

The titer of the sample can vary from 1/80 to 1/2560.

	1
A	Sample 1 5 µl + 95 µl sample diluent
B	25 µl sample present in A1 + 75 µl Control Cells
C	25 µl sample present in A1 + 75 µl Test Cells
D	25 µl sample diluent + 25 µl sample present in A1 + 75 µl Test Cells
E	25 µl sample diluent + 25 µl sample present in D1 + 75 µl Test Cells
F	25 µl sample diluent + 25 µl sample present in E1 + 75 µl Test Cells
G	25 µl sample diluent + 25 µl sample present in F1 + 75 µl Test Cells
H	25 µl sample diluent + 25 µl sample present in G1; discard 25 µl of solution; add 75 µl Test Cells

- Wait for 60 minutes on a vibration-free bench and observe the formation of agglutinate or erythrocytes compact button.

9. TEST VALIDATION

Perform the test with positive and negative control.

If the result is different from the expected, contact the Scientific Support:

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE TEST

In absence of agglutination the erythrocytes sediment, forming a compact button in the center of the well.

In case of agglutination the erythrocytes sediment, forming a homogeneously diffused layer on the bottom of the well and/or forming a characteristic ring structure.

The agglutination of the Test Cells and the simultaneous absence of agglutination of the Control Cells is an index of the presence of anti-Treponema pallidum antibodies.

The absence of agglutination indicates that the antibodies, if present, are at a concentration lower than the test sensitivity limit.

The Control Cells sediment forming a particularly compact button; in the event of their agglutination, the test is not to be considered valid.

The semi-quantitative titer is given by the last dilution able to make agglutination.

The presence of an erythrocytes compact button on the bottom is interpreted as a negative result.

The titer 1/80 is considered the limit between non-reactive and reactive samples.

11. LIMITATIONS

The antibodies detected by TPHA develop 4-5 weeks after the onset of the disease.

No tests in haemoagglutination on serum can distinguish between antibodies from Treponema pallidum infections and antibodies from infections caused by other pathogen treponemas.

Lepromatous leprosy and infectious mononucleosis can show false positive reactions with this type of test.

The test result should be always evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

12. ANALYTICAL SENSITIVITY

Analytical sensitivity: 1/80.

13. METHOD COMPARISON

In an experimentation 419 samples have been tested.

Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	207	0	207
	-	3	209	212
	Total	210	209	419

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):

98.6% CI_{95%}: 95.9.-99.5

Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):

100% CI_{95%}: 98.2-100

The agreement between the two methods is excellent with a Cohen's Kappa of 0.98.

14. REFERENCES

- Lesiński J., Krach J. and Kadziewicz E. Specificity, sensitivity and diagnostic value of the TPHA test. British Journal of Venereal Diseases (1974) 50,334.
- Rathlev T. Haemagglutination test utilizing pathogenic Treponema pallidum for the sero-diagnosis of Syphilis. British Journal of Venereal Diseases (1967), 43, 181.
- Uete T., Fukazawa S., Ogi K. and Takeuchi Y. Clinical evaluation of T. pallidum haemagglutination test. British Journal of Venereal Diseases (1971) 47, 73.
- Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol (2005); 16(1):45-51.
- Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. WHO (2013).

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusqu'à Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbrikante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote
	EN ES IT	CE marking of conformity Marcado CE de conformidad Marcatura CE di conformità	FR GR PT	Marquage de conformité CE Σημανση συμμορφωσης CE Marcação CE de conformidade