

TPHA-DAT ADVANCED



DIESSE

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

REF 26041

CE
0123



ISTRUZIONI PER L'USO

TPHA-DAT ADVANCED

Solo per uso diagnostico in vitro

1. DESTINAZIONE D'USO

TPHA-DAT ADVANCED (REF 26041) è un test di emoagglutinazione per la rilevazione semi-quantitativa degli anticorpi specifici diretti verso il *Treponema pallidum*.

Il test viene eseguito su siero umano tramite emoagglutinazione passiva utilizzando lo strumento AUTO-DAT (REF 26001). Il kit è destinato a determinare l'esposizione all'infezione da *Treponema pallidum* e ad essere utilizzato come ausilio nella diagnosi di Sifilide.

Il test non è destinato a essere utilizzato per rilevare l'esposizione all'infezione da *Treponema pallidum* nel sangue, componenti del sangue, cellule, tessuti, organi o qualsiasi loro derivato al fine di valutare la loro idoneità per trasfusioni, trapianti o somministrazione cellulare.

Deve essere utilizzato esclusivamente da personale professionale di laboratorio.

2. INTRODUZIONE

La Sifilide, causata dalle spirochete di *Treponema pallidum* (subsp. *pallidum*), è un'infezione cronica con molte manifestazioni cliniche diverse che si verificano in fasi distinte. Generalmente, questa malattia infettiva sistemica viene contratta tramite contatto sessuale diretto e presenta lesioni contenenti treponemi. Gli unici ospiti conosciuti sono gli esseri umani.

Sono disponibili molti test per la diagnosi diretta e indiretta della sifilide, ma non esiste ancora un unico test ottimale.

I metodi diagnostici diretti includono l'individuazione del *T. pallidum* attraverso l'esame microscopico del fluido o degli strisci delle lesioni, l'esame istologico dei tessuti o i metodi di amplificazione dell'acido nucleico come la reazione a catena della polimerasi (PCR).

La diagnosi indiretta si basa su test sierologici per il rilevamento di anticorpi. I test sierologici rientrano in due categorie:

1. test non treponemici di screening
2. test treponemici di conferma

I test treponemici sono test specifici per la Sifilide in quanto rilevano anticorpi specifici verso antigeni del *Treponema pallidum*. Generalmente questi test non vengono utilizzati per la valutazione della risposta al trattamento a causa della reattività persistente per tutta la vita del paziente.

La diagnosi deve essere basata sulla correlazione dei risultati del test con altri riscontri clinici.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test si basa sul principio dell'emoagglutinazione.

Gli anticorpi specifici presenti 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. La reazione è negativa in caso l'aggregato abbia la forma di un bottone compatto.

Il test è applicato allo strumento AUTO-DAT (REF 26001), che cattura l'immagine della reazione avvenuta, la analizza, fornisce e stampa un risultato calcolato sulla base di uno specifico algoritmo.

I risultati sono espressi in titolo ed è possibile effettuare la conferma del titolo ottenuto visivamente.

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test sia 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 umana 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.
3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
4. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Scheda di Sicurezza (disponibile sul sito DIESSE: www.diesse.it)
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 reagenti a temperatura ambiente (18-30°C).

1. Il test deve essere utilizzato insieme allo strumento AUTO-DAT (REF 26001), seguendo rigorosamente le Istruzioni per l'Uso ed il Manuale Utente dello strumento.
2. Non modificare la Procedura del test. Non sostituire i reagenti con quelli di altri fornitori o di altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile tra i lotti.
3. Controllare che lo strumento sia impostato correttamente (vedi Manuale Utente).
4. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
5. Non utilizzare campioni emolizzati, lipemici, itterici con una concentrazione di interferenti superiore a quella testata

(secondo le indicazioni riportate nel capitolo "Specificità analitica").

6. Non utilizzare il dispositivo dopo la data di scadenza.
7. Dopo l'uso riporre i reagenti a 2-8°C.
8. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il kit è sufficiente per 50 determinazioni

TEST CELLS

CELLULE TEST

3 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.

Attenzione: Conservare le fiale in posizione verticale quando non si usano. Portare a temperatura ambiente prima dell'uso. Non agitare vigorosamente.

SAMPLE DILUENT

DILUENTE CAMPIONI

1 x 13 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*. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL -

CONTROLLO NEGATIVO

1 x 0.3 mL

Contenuto: siero animale (coniglio) diluito non contenente anticorpi anti-*Treponema pallidum*. Liquido, pronto all'uso

ALTRO MATERIALE RICHiesto, MA NON FORNITO:

- Strumento AUTO-DAT (REF 26001)
- AUTO-DAT MICROPLATES TPHA (REF 26004)
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente volumi di 5-100 µl.
- Guanti monouso
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C

Dopo il primo utilizzo le micropiastre devono essere conservate a temperatura ambiente.

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

La stabilità dei reagenti non cambia dopo apertura del flacone, purché l'utilizzatore faccia attenzione a mantenere il prodotto al riparo da possibile contaminazione microbica.

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio.

Secondo la linea guida CLSI H18-A3 i campioni di siero da analizzare devono essere coagulati prima della centrifugazione; la coagulazione spontanea e completa avviene normalmente entro 30-60 minuti a 22°C-25°C. Si raccomanda di separare fisicamente il siero, mediante centrifugazione, dal contatto con le cellule il più presto possibile con un limite di tempo massimo di 2 ore dal momento della raccolta.

Il siero fresco può essere mantenuto per 6 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C per almeno 11 mesi.

Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Dopo lo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio.

L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei.

La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

8. PROCEDIMENTO

La valutazione avviene osservando l'agglutinazione del campione alle diluizioni 1/80, 1/640 e 1/5120. Per effettuare la pre-diluizione dei campioni utilizzare i pozzetti delle righe A ed E, seguendo quanto riportato di seguito.

1. Aggiungere 125 µl di Diluente campioni al pozzetto A1 e 35 µl di Diluente campioni ai pozzetti C1 e D1.
2. Aggiungere 5 µl di campione al pozzetto A1. Fare attenzione a non trasferire alcun elemento cellulare. **Omogenizzare la soluzione evitando la formazione di bolle.**
3. Prelevare 35 µl di soluzione in A1 e trasferirli nel pozzetto B1. **Evitare la formazione di bolle.**
4. Prelevare 5 µl di soluzione in A1 e trasferirli nel pozzetto C1. **Omogenizzare accuratamente.**
5. Prelevare 5 µl di soluzione in C1 e trasferirli nel pozzetto D1. **Omogenizzare accuratamente e scartare 5 µl di soluzione.**
6. Scartare 55 µl dal pozzetto A1.
7. Ripetere gli stessi passaggi per il secondo campione utilizzando i pozzetti da E1 ad H1 e le colonne dalla 2 alla 12 per gli altri campioni.

NOTA: I controlli positivi e negativi vengono forniti pronti all'uso e non richiedono pre-diluizione. Devono essere utilizzati ad ogni seduta come descritto di seguito.

- a) Aggiungere 35 µl di Diluente campioni in C e D
- b) Aggiungere 35 µl di Controllo (positivo o negativo) in A e B.
- c) Aggiungere 5 µl di Controllo (positivo o negativo) in C. **Omogenizzare senza formare bolle.**
- d) Prelevare 5 µl da C e trasferirli nel pozzetto D. **Omogenizzare accuratamente e scartare 5 µl di soluzione.**

- e) Eseguire gli stessi passaggi per l'altro Controllo utilizzando i pozzetti da E ad H.

Una volta effettuate le diluizioni per campioni e controlli, procedere all'aggiunta dei reagenti:

8. Aggiungere 75 µl di CELLULE DI CONTROLLO in A ed E.
9. Aggiungere 75 µl di CELLULE DI TEST negli altri pozzetti.

Schema dispensazione campione

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
SAMPLE	A	125µl DILUENT +5µl SAMPLE	DISCARD 55µl	+75µl CONTROL CELLS
	B	35µl A1		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl A1		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS

Schema dispensazione controlli

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
CONTROL +	A	+35µl CONTROL +		+75µl CONTROL CELLS
	B	+35µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS
CONTROL -	E	+35µl CONTROL -		+75µl CONTROL CELLS
	F	+35µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	G	35µl DILUENT +5µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	H	35µl DILUENT +5µl G1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS

Una volta effettuate le diluizioni ed aggiunti i reattivi posizionare la piastra nello strumento AUTO-DAT (REF 26001) e seguire le istruzioni dello strumento.

Nel caso in cui lo strumento sia occupato, l'incubazione del test può essere effettuata a temperatura ambiente su un banco privo di vibrazioni. In tal caso, dopo 60 minuti di incubazione, inserire la micropiastra nello strumento AUTO-DAT (REF. 26001) con la massima cautela, evitando urti accidentali.

Al termine dell'analisi, estrarre le piastre dallo strumento e coprire con il copripiastra i pozzetti in cui è avvenuta la reazione.

ATTENZIONE: in caso di mancata aggiunta dell'antigene al campione, lo strumento registrerà un errore.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Usare i controlli forniti ad ogni seduta.

Se il risultato è diverso da quello previsto, contattare il Customer Care.

Tel: 0039 0577 319554

email: scientificsupport@diesse.it;
customer-care@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Lo strumento fornisce il risultato in titolo.

Il test sul campione in esame può essere interpretato come segue:

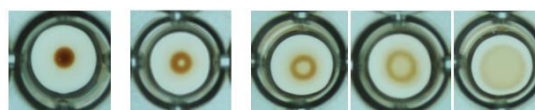
POSITIVO: quando il risultato è $\geq 1/80$

NEGATIVO: quando il risultato è $< 1/80$

È consigliabile verificare visivamente i risultati ottenuti per conferma del referto (soprattutto nel caso di risultato NEG < 1/80).

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.



Negativo NEG <1/80

Positivo: $\geq 1/80$

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

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

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

11. LIMITAZIONI DEL TEST

Il prodotto deve essere usato solo da personale professionale di laboratorio.

Il test non è applicabile a campioni diversi dal siero.

Il test è applicabile esclusivamente allo strumento AUTO-DAT (REF 26001).

I test treponemici diventano positivi 5-15 giorni dopo l'inizio dei sintomi. Non è disponibile un singolo test o uno standard di riferimento per ogni stadio 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.

Tutti i valori ottenuti necessitano di un'attenta interpretazione che non prescinda da altri indicatori relativi allo stesso paziente.

Il test, infatti, non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica ed il risultato ottenuto deve sempre essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

12. RANGE DI MISURAZIONE

Range di misurazione: NEG - 1/20480 (Titolo)

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 3 campioni (1 Negativo, 1 Positivo basso e 1 Positivo alto) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Fattore Reumatoide (44 – 220 IU/ml)

Bilirubina (4.5 mg/dl – 45 mg/dl)

Trigliceridi (250 mg/dl – 1500 mg/dl)

Emoglobina (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)

La presenza nel siero in esame delle sostanze interferenti sopra riportate, non altera il risultato del test.

14. CROSS-REATTIVI

Sono stati testati 18 campioni, positivi a Borrelia (3), Herpes Virus (3), Toxoplasma (3), Epstein-Barr (3), Cytomegalovirus (3), Rubella (3).

Non sono state rilevate reazioni crociate significative con l'eccezione di Epstein-Barr virus.

15. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 220 campioni con kit Diesse e con un altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	127	0	127
	-	0	93	93
	Totale	127	93	220

Overall Percent Agreement = 100.0% CI_{95%}: 93.3-100.0

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica)= 100.0% CI_{95%}: 97.1-100.0

Percent Negative Agreement (~Specificità Diagnostica)

=100.0% CI_{95%}:96.0-99.9

Positive Predictive Value (PPV) = 100.0% CI_{95%}: 100.0-100.0

Negative Predictive Value (NPV) = 100.0% CI_{95%}: 100.0-100.0

Il grado di concordanza tra i due metodi risulta essere ottimo con un valore di K (Coefficiente di Cohen) di 1.00.

16. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

La precisione e la ripetibilità sono state valutate su repliche di campioni negativi e positivi, in tre lotti diversi, con operatori diversi che eseguivano il test, in giorni diversi e con strumenti diversi.

Tutti i risultati ottenuti rientrano nei criteri di accettazione (Agreement % ≥ 95% tra i risultati attesi e quelli ottenuti) dimostrando la precisione e la ripetibilità del metodo.

18. BIBLIOGRAFIA

- I. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Jan;16(1):45-51. doi: 10.1155/2005/597580. PMID: 18159528; PMCID: PMC2095002.
- II. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Book)
- III. WHO guidelines for the treatment of Treponema pallidum (Syphilis) (201).
- IV. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočník M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021 Mar;35(3):574-588. doi: 10.1111/jdv.16946. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094521.
- V. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol. 2015 Feb;22(2):137-47. doi: 10.1128/000681-14. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25428245; PMCID: PMC4308867.
- VI. CLSI H18-A3 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline — Third Edition. Vol. 24 No. 38

19. SEGNALAZIONE DI INCIDENTE

Se si è verificato un incidente grave in relazione a questo dispositivo nel territorio di mercato dell'Unione Europea, si prega di segnalarlo senza indugio al produttore e all'autorità competente del proprio Stato membro.

20. SINTESI RELATIVA ALLA SICUREZZA E ALLE PRESTAZIONI

Questo documento, che sarà reso disponibile sul database di EUDAMED (quando questo sarà completamente implementato e funzionante), fa parte della Documentazione Tecnica e può essere richiesto al produttore.



INSTRUCTIONS FOR USE

TPHA-DAT ADVANCED

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

TPHA-DAT ADVANCED (REF 26041) is a hemagglutination test for the semi-quantitative detection of specific antibodies directed against *Treponema pallidum*.

The test is performed on human serum by passive hemagglutination using the AUTO-DAT instrument (REF 26001). The kit is intended to determine exposure to *Treponema pallidum* infection and to be used as an aid in the diagnosis of Syphilis.

The test is not intended to be used to detect exposure to *Treponema pallidum* infection in blood, blood components, cells, tissues, organs, or any derivative thereof for the purpose of assessing their suitability for transfusion, transplantation, or cell administration.

It should be used only by professional laboratory personnel.

2. INTRODUCTION

Syphilis, caused by *Treponema pallidum* (subsp. *pallidum*) spirochetes, is a chronic infection with many different clinical manifestations occurring in distinct stages. Generally, this systemic infectious disease is contracted through direct sexual contact and has lesions containing treponemes. The only known hosts are humans.

Many tests are available for direct and indirect diagnosis of syphilis, but there is still no single optimal test.

Direct diagnostic methods include detection of *T. pallidum* by microscopic examination of fluid or smears from lesions, histological examination of tissues, or nucleic acid amplification methods such as polymerase chain reaction (PCR).

Indirect diagnosis is based on serologic tests for the detection of antibodies. Serological tests fall into two categories:

1. nontreponemal screening tests
2. confirmatory treponemal tests.

Treponemal tests are specific tests for syphilis in that they detect specific antibodies to *Treponema pallidum* antigens. Generally, these tests are not used for assessment of treatment response because of persistent reactivity throughout the patient's life.

Diagnosis should be based on correlation of test results with other clinical findings.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The test is based on the principle of hemagglutination.

Specific antibodies in the patient's serum bind to treponemal antigens (Nichols strain) attached to avian erythrocytes.

The reaction is positive in case of agglutination of cells. The reaction is negative in case the aggregate has the shape of a compact button.

The test is applied to the AUTO-DAT instrument (REF 26001), which captures the image of the reaction that has occurred, analyzes it, provides and prints a result calculated on the basis of a specific algorithm.

The results are expressed in titer, and confirmation of the visually obtained titer is possible.

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 material of human origin.

Waste disposal: serum samples, calibrators and strips 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.
3. Wash hands thoroughly after placing the devices in the Chorus/Chorus TRIO instrument.
4. Refer to the Safety Data Sheet (available on DIESSE website: www.diesse.it) for the safety characteristics of 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.

All materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical Precautions

Before use, bring the reagents to room temperature (18-30°C).

1. The test should be used together with the AUTO-DAT instrument (REF 26001), strictly following the Instructions for Use and User's Manual of the instrument.
2. Do not change the Test Procedure. Do not substitute reagents with those from other suppliers or other batches unless it is specifically stated that the reagent is interchangeable between batches.
3. Check that the instrument is set up correctly (see User's Manual).
4. Avoid the use of self-defrosting freezers for sample storage.
5. Do not use hemolyzed, lipemic, jaundiced samples with a higher concentration of interferents than tested (according to the directions in the chapter "Analytical Specificity").
6. Do not use the device after the expiry date.
7. After use, store reagents at 2-8°C.
8. Avoid microbial pollution of reagents as this reduces the validity of the product and may result in erroneous results.

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

The kit is sufficient for 50 tests.

TEST CELLS

3 x 4 mL

Content: avian erythrocytes sensitized with *Treponema pallidum* antigen.

CONTROL CELLS

1 x 4 mL

Content: non-sensitized avian erythrocytes.

Warning: Store vials upright when not in use. Bring to room temperature before use. Do not shake vigorously.

SAMPLE DILUENT

1 x 13 mL

Contents: saline solution containing substances inhibiting nonspecific reactions.

CONTROL +

1 x 0.3 mL

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

CONTROL -

1 x 0.3 mL

Contents: diluted animal (rabbit) serum not containing anti-*Treponema pallidum* antibodies. Liquid, ready-to-use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- AUTO-DAT INSTRUMENT (REF 26001)
- AUTO-DAT MICROPLATES TPHA (REF 26004)
- Micropipettes capable of accurately taking volumes of 5-100 µl.
- Disposable gloves
- Containers for collection of potentially infectious materials

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

After first use, microplates should be stored at room temperature.

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

The stability of the reagents does not change after opening the bottle, as long as the user takes care to keep the product away from possible microbial contamination.

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum collected from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. According to the guideline CLSI H18-A3 Serum specimens to be tested should be clotted before centrifugation; spontaneous and complete clotting normally occurs within 30 to 60 minutes at 22°C-25°C.

It is recommended that serum be physically separated, by centrifugation, from contact with cells as soon as possible with a maximum time limit of 2 hours from the time of collection.

The fresh serum may be stored for 6 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at temperature ≤ -20°C for a least 11 months

The sample can be thawed a maximum of 3 times.

Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be shaken carefully before use.

Heat-inactivation can rise to erroneous results.

The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

8. ASSAY PROCEDURE

Evaluation is done by observing sample agglutination at dilutions 1/80, 1/640 and 1/5120. To perform pre-dilution of samples, use the wells in rows A and E, following the steps below.

1. Add 125 µl of Sample Diluent to well A1 and 35 µl of Sample Diluent to wells C1 and D1.
2. Add 5 µl of sample to well A1. Be careful not to transfer any cellular elements. Homogenize the solution while avoiding the formation of bubbles.
3. Take 35 µl of solution in A1 and transfer to well B1. Avoid the formation of bubbles.
4. Take 5 µl of solution in A1 and transfer to well C1. Homogenize thoroughly.
5. Take 5 µl of solution in C1 and transfer to well D1. Homogenize thoroughly and discard 5 µl of solution.
6. Discard 55 µl from well A1.
7. Repeat the same steps for the second sample using wells E1 to H1 and columns 2 to 12 for the other samples.

NOTE: Positive and negative controls are supplied ready-to-use and do not require pre-dilution. They should be used at each run as described below.

- a) Add 35 µl of Sample Diluent in C and D.
- b) Add 35 µl of Control (positive or negative) in A and B.
- c) Add 5 µl of Control (positive or negative) in C. **Homogenize without forming bubbles.**
- d) Take 5 µl from C and transfer to well D. **Homogenize thoroughly and discard 5 µl of solution.**
- e) Perform the same steps for the other Control using wells E to H.

Once the dilutions for samples and controls have been made, proceed to add the reagents:

8. Add 75 µl of CONTROL CELLS in A and E.
9. Add 75 µl of TEST CELLS to the other wells.

Sample dispensing scheme

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
SAMPLE	A	125µl DILUENT +5µl SAMPLE	DISCARD 55µl	+75µl CONTROL CELLS
	B	35µl A1		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl A1		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS

Control dispensing scheme

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
CONTROL +	A	+35µl CONTROL +		+75µl CONTROL CELLS
	B	+35µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS
CONTROL -	E	+35µl CONTROL -		+75µl CONTROL CELLS
	F	+35µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	G	35µl DILUENT +5µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	H	35µl DILUENT +5µl G1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS

Once dilutions have been made and reagents added place the plate in the AUTO-DAT instrument (REF 26001) and follow the instrument's instructions.

In case the instrument is occupied, the test incubation can be carried out at room temperature on a vibration-free bench. In such a case, after 60 minutes of incubation, insert the microplate into the AUTO-DAT instrument with utmost caution, avoiding accidental shocks.

At the end of the analysis, remove the plates from the instrument and cover the wells where the reaction took place with the plate cover.

WARNING: If antigen is not added to the sample, the instrument will register an error.

9. TEST VALIDATION

Use the controls provided at each session.

If the result is different than expected, contact Customer Care.

Tel: 0039 0577 319554
email: scientificsupport@diesse.it;
customercare@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE RESULTS

The instrument gives the result in titer.

The test on the test sample can be interpreted as follows:

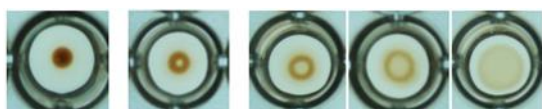
POSITIVE: when the result is $\geq 1/80$

NEGATIVE: when the result is $< 1/80$

It is recommended to visually check the results obtained to confirm the report (especially in the case of NEG result $< 1/80$).

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

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



Negative NEG $< 1/80$

Positive: $\geq 1/80$

Agglutination of Test Cells and simultaneous absence of agglutination of Control Cells indicates the presence of anti-Treponema pallidum antibodies.

Control Cells sediment forming a particularly compact button; in case their agglutination occurs, the test is to be considered invalid.

The presence of a compact button of erythrocytes sedimented at the bottom is interpreted as a negative result.

11. LIMITATIONS

The product should be used only by professional laboratory personnel.

The test is not suitable for samples different from human serum. The test is only applicable to the AUTO-DAT instrument (REF 26001).

Treponemal tests become positive 5-15 days after the onset of symptoms. No single test or reference standard is available for each stage of the disease.

No hemagglutination test on serum can distinguish antibodies arising from infections caused by Treponema pallidum from those arising from infections caused by other treponemal pathogens.

All values obtained need careful interpretation that does not prescind from other indicators related to the same patient.

The test, indeed, cannot be used alone for a clinical diagnosis and the test result should be evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

12. REFERENCE RANGE

Measurement Range: NEG - 1/20480 (Titer)

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

3 samples (1 Negative, 1 Cut-Off and 1 Positive) were spiked with the following potentially interfering factors and then tested :

Rheumatoid Factor (44 – 220 IU/ml)
Bilirubin (4.5 mg/dl – 45 mg/dl)
Triglycerides (250 mg/dl – 1500 mg/dl)
Hemoglobin (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)

The presence in the serum sample of the interfering substances described above does not affect the test result.

14. CROSS-REACTIONS

18 samples, positive to Borrelia (3), Herpes Virus (3), Toxoplasma (3), Epstein-Barr (3), Cytomegalovirus (3), Rubella (3) were tested.

No significant cross-reactions were found except for Epstein-Barr virus.

15. METHOD COMPARISON

In an experimentation 220 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit.

Data are summarized in the following table :

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	127	0	127
	-	0	93	93
	Total	127	93	220

Overall Percent Agreement = 100.0% CI95%: 93.3-100.0
 Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica)= 100.0%
 CI95%: 97.1-100.0
 Percent Negative Agreement (~Specificità Diagnostica)
 =100.0% CI95%:96.0-99.9
 Positive Predictive Value (PPV) = 100.0% CI95%: 100.0-100.0
 Negative Predictive Value (NPV) = 100.0% CI95%: 100.0-100.0

The agreement between the two methods is excellent with a Cohen's Kappa of 1.00.

16. PRECISION AND REPEATABILITY

Precision and repeatability were evaluated on replicates of negative and positive samples, in three different batches, with different operators performing the test, on different days, and with different instruments.

All results obtained fell within the acceptance criteria (Agreement % $\geq$ 95% between expected and obtained results) demonstrating the accuracy and repeatability of the method.

17. REFERENCES

- I. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Jan;16(1):45-51. doi: 10.1155/2005/597580. PMID: 18159528; PMCID: PMC2095002.
- II. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Book)
- III. WHO guidelines for the treatment of *Treponema pallidum* (Syphilis) (201).
- IV. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočník M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021 Mar;35(3):574-588. doi: 10.1111/jdv.16946. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094521.
- V. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol. 2015 Feb;22(2):137-47. doi: 10.1128/CVI.00681-14. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25428245; PMCID: PMC4308867.
- VI. CLSI H18-A3 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline — Third Edition. Vol. 24 No. 38

18. INCIDENT REPORTING

If any serious incident in relation to this device has occurred in the European Union market territory, please report without delay to the manufacturer and competent authority of your Member State.

19. SUMMARY OF SAFETY AND PERFORMANCE

This document, which will be made available on the EUDAMED database (when this is fully implemented and functioning), is part of the Technical Documentation and can be requested from the manufacturer.



MODE D'EMPLOI

TPHA-DAT ADVANCED

Pour le diagnostic in vitro uniquement

1. UTILISATION PRÉVUE

TPHA-DAT ADVANCED (RÉF 26041) est un test d'hémagglutination pour la détection semi-quantitative d'anticorps spécifiques vers le *Treponema pallidum*.

Le test est réalisé sur du sérum humain par hémagglutination passive à l'aide de l'instrument AUTO-DAT (RÉF 26001). Le kit est destiné à déterminer l'exposition à l'infection par *Treponema pallidum* et à servir d'aide au diagnostic de la syphilis.

Le test n'est pas destiné à être utilisé pour détecter l'exposition à l'infection par *Treponema pallidum* dans le sang, les composants sanguins, les cellules, les tissus, les organes ou tout dérivé de ceux-ci afin d'évaluer leur aptitude à la transfusion, à la transplantation ou à l'administration de cellules.

Il ne doit être utilisé que par le personnel professionnel du laboratoire.

2. INTRODUCTION

La syphilis, causée par les spirochètes *Treponema pallidum* (subsp. *pallidum*), est une infection chronique avec de nombreuses manifestations cliniques différentes se produisant dans des phases distinctes. En général, cette maladie infectieuse systémique est contractée par contact sexuel direct et présente des lésions contenant des tréponèmes. Les seuls hôtes connus sont les êtres humains.

De nombreux tests sont disponibles pour le diagnostic direct et indirect de la syphilis, mais il n'existe pas encore de test optimal unique.

Les méthodes de diagnostic directes comprennent la détection de *T. pallidum* par l'examen microscopique du liquide ou des frottis des lésions, l'examen histologique des tissus ou les méthodes d'amplification de l'acide nucléique telles que la réaction en chaîne de la polymérase (PCR).

Le diagnostic indirect repose sur des tests sérologiques de détection des anticorps. Les tests sérologiques se divisent en deux catégories :

1. Tests de dépistage non tréponémiques
2. tests tréponémiques de confirmation

Les tests tréponémiques sont des tests spécifiques pour la syphilis car ils détectent des anticorps spécifiques contre les antigènes de *Treponema pallidum*. En général, ces tests ne sont pas utilisés pour évaluer la réponse au traitement en raison de la réactivité persistante tout au long de la vie du patient.

Le diagnostic doit être basé sur la corrélation entre les résultats des tests et les autres résultats cliniques.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test est basé sur le principe de l'hémagglutination.

Des anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient se lient aux antigènes tréponémiques (souche Nichols) fixés sur les érythrocytes aviaires.

La réaction est positive en cas d'agglutination des cellules. La réaction est négative si l'agrégat se présente sous la forme d'un bouton compact.

Le test est appliqué à l'instrument AUTO-DAT (RÉF 26001), qui capture l'image de la réaction qui a eu lieu, l'analyse, délivre et imprime un résultat calculé sur la base d'un algorithme spécifique.

Les résultats sont exprimés sous forme de titre et il est possible de confirmer visuellement le titre obtenu.

4. PRÉCAUTIONS

À DES FINS DE DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.

Ce kit contient des matériaux d'origine humaine qui ont été testés et se sont révélés négatifs pour le HBsAg et les anticorps anti-VIH-1, anti-VIH-2 et anti-HCV. Aucun test de diagnostic ne pouvant garantir l'absence d'agents infectieux, tout matériel d'origine humaine doit être considéré comme potentiellement infecté. Tous les réactifs et échantillons doivent être manipulés conformément aux règles de sécurité normalement adoptées dans le laboratoire.

Élimination des résidus : les échantillons et réactifs utilisés doivent être traités comme des résidus infectés, puis éliminés conformément aux dispositions de la loi.

Avertissements en matière de sécurité personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche.
2. Utiliser des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
3. Se laver soigneusement les mains une fois le test terminé.
4. En ce qui concerne les caractéristiques de sécurité des réactifs contenus dans le kit, veuillez vous référer à la Fiche de Sécurité (disponible sur le site Internet de DIESSE : www.diesse.it)
5. Tout déversement de matériaux potentiellement infectés doit être immédiatement éliminé à l'aide de papier absorbant et la zone polluée doit être décontaminée, par exemple avec de l'hypochlorite de sodium à 1 %, avant de poursuivre le travail. Si un acide est présent, l'hypochlorite de sodium ne doit pas être utilisé avant que la zone ait été séchée. Tous les matériaux utilisés pour décontaminer les déversements accidentels, y compris les gants, doivent être éliminés comme des déchets potentiellement infectieux. Ne pas autoclaver les matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.

Avertissements analytiques

Amener les réactifs à température ambiante (18-30°C) avant utilisation.

1. Le test doit être utilisé avec l'instrument AUTO-DAT (RÉF 26001), en suivant scrupuleusement le mode d'emploi et le manuel d'utilisation de l'instrument.
2. Ne pas modifier la procédure de test. Ne pas remplacer les réactifs par ceux d'autres fournisseurs ou d'autres lots, sauf

s'il est spécifiquement indiqué que le réactif est interchangeable entre les lots.

3. Vérifier que l'instrument est correctement configuré (voir le manuel de l'utilisateur).
4. Éviter d'utiliser des congélateurs à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons.
5. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques, ictériques avec une concentration d'interférents supérieure à celle testée (selon les indications du chapitre « Spécificité analytique »).
6. Ne pas utiliser le dispositif après la date de péremption.
7. Après utilisation, conserver les réactifs à 2-8°C.
8. Éviter la contamination microbienne des réactifs, car elle réduit la validité du produit et peut conduire à des résultats erronés.

5. COMPOSITION DU KIT ET PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Le kit est suffisant pour 50 déterminations

TEST CELLULES

CELLULES TEST

3 x 4 mL

Contenu: érythrocytes aviaires sensibilisés avec l'antigène *Treponema pallidum*.

CELLULES DE CONTRÔLE

CELLULES DE CONTRÔLE

1 x 4 mL

Contenu: érythrocytes aviaires non sensibilisés.

Attention : Conserver les flacons en position verticale lorsqu'ils ne sont pas utilisés. Amener à température ambiante avant utilisation. Ne pas agiter vigoureusement.

ÉCHANTILLON DILUANTS

ÉCHANTILLONS DILUANTS

1 x 13 mL

Contenu: solution saline contenant des inhibiteurs de réaction non spécifique.

CONTRÔLE +

CONTRÔLE POSITIF

1 x 0.3 mL

Contenu: sérum humain dilué contenant des anticorps anti-*Treponema pallidum*. Liquide, prêt à l'emploi.

CONTRÔLE -

CONTRÔLE NÉGATIF

1 x 0.3 mL

Contenu: sérum animal (lapin) dilué ne contenant pas d'anticorps anti-*Treponema pallidum*. Liquide, prêt à l'emploi

AUTRE MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI :

- Instrument AUTO-DAT (RÉF 26001)
- MICROPLAQUES AUTO-DAT TPHA (RÉF 26004)
- Micropipettes capables de prélever avec précision des volumes de 5 à 100 µl.
- Gants jetables
- Récipients pour la collecte de matériel potentiellement infecté

6. MODE DE STOCKAGE ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à 2/8°C

Après la première utilisation, les microplaques doivent être conservées à température ambiante.

La date de péremption est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette externe de l'emballage.

La stabilité des réactifs ne change pas après l'ouverture du flacon, pourvu que l'utilisateur veille à préserver le produit d'une éventuelle contamination microbienne.

7. TYPE D'ÉCHANTILLONS ET STOCKAGE

Le type d'échantillon est le sérum obtenu à partir de sang prélevé par ponction veineuse et manipulé conformément aux procédures de laboratoire standard.

Selon la directive H18-A3 du CLSI, les échantillons de sérum à analyser doivent être coagulés avant d'être centrifugés ; la coagulation spontanée et complète se produit normalement en 30 à 60 minutes à une température de 22 à 25°C. Il est recommandé de séparer physiquement le sérum, par centrifugation, du contact avec les cellules dès que possible, avec un délai maximum de 2 heures à partir du moment du prélèvement.

Le lactosérum frais peut être conservé pendant 6 jours à 2/8°C ; pour des périodes de stockage plus longues, il peut être congelé à -20°C pendant au moins 11 mois.

L'échantillon peut subir un maximum de 3 décongélations.

Éviter d'utiliser des congélateurs à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Après décongélation, agiter soigneusement l'échantillon avant de le doser.

L'inactivation par la chaleur peut donner des résultats erronés.

La qualité de l'échantillon peut être sérieusement affectée par la contamination microbienne, ce qui peut conduire à des résultats erronés.

8. PROCÉDURE

L'évaluation se fait en observant l'agglutination de l'échantillon aux dilutions 1/80, 1/640 et 1/5120. Pour pré-diluer les échantillons, utiliser les puits des rangées A et E, en suivant les instructions ci-dessous.

1. Ajouter 125 µl de diluant d'échantillon au puits A1 et 35 µl de diluant d'échantillon aux puits C1 et D1.
2. Ajouter 5 µl d'échantillon au puits A1. Ne pas transférer d'éléments cellulaires. **Homogénéiser la solution en évitant la formation de bulles.**
3. Prélever 35 µl de la solution en A1 et les transférer dans le puits B1. **Éviter la formation de bulles.**
4. Prélever 5 µl de la solution en A1 et les transférer dans le puits C1. **Homogénéiser soigneusement.**
5. Prélever 5 µl de la solution en C1 et les transférer dans le puits D1. **Homogénéiser soigneusement et jeter 5 µl de solution.**
6. Jeter 55 µl du puits A1.
7. Répéter les mêmes étapes pour le deuxième échantillon en utilisant les puits de E1 à H1 et les colonnes de 2 à 12 pour les autres échantillons.

REMARQUE : Les contrôles positifs et négatifs sont fournis prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de pré-dilution. Ils doivent être utilisés à chaque session comme décrit ci-dessous.

- Ajouter 35 µl de diluant d'échantillon dans C et D
- Ajouter 35 µl de contrôle (positif ou négatif) dans A et B.
- Ajouter 5 µl de contrôle (positif ou négatif) dans C.
Homogénéiser sans former de bulles.
- Prélever 5 µl de C et les transférer dans le puits D.
Homogénéiser soigneusement et jeter 5 µl de solution.
- Effectuer les mêmes étapes pour l'autre contrôle en utilisant les puits de E à H.

Une fois les dilutions des échantillons et des contrôles effectuées, procéder à l'ajout des réactifs :

- Ajouter 75 µl de CELLULES DE CONTRÔLE dans A et E.
- Ajouter 75 µl de CELLULES DE TEST dans les autres puits.

Schéma de distribution échantillon

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
SAMPLE	A	125µl DILUENT +5µl ÉCHANTILLO	JETER 55µl	+75µl CONTROL CELLS
	B	35µl A1		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl A1		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	JETER 5µl	+75µl TEST CELLS

Contrôles du schéma de distribution

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
CONTROL +	A	+35µl CONTROL +		+75µl CONTROL CELLS
	B	+35µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	JETER 5µl	+75µl TEST CELLS
CONTROL -	E	+35µl CONTROL -		+75µl CONTROL CELLS
	F	+35µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	G	35µl DILUENT +5µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	H	35µl DILUENT +5µl G1	JETER 5µl	+75µl TEST CELLS

Une fois les dilutions effectuées et les réactifs ajoutés, placer la plaque dans l'instrument AUTO-DAT (RÉF 26001) et suivre les instructions de l'instrument.

Si l'instrument est occupé, l'incubation du test peut être effectuée à température ambiante sur un banc exempt de vibrations. Dans ce cas, après 60 minutes d'incubation, insérer la micro-plaque dans l'instrument AUTO-DAT (RÉF. 26001) avec le plus grand soin, en évitant les chocs accidentels.

À la fin de l'analyse, retirer les plaques de l'instrument et couvrir les puits dans lesquels la réaction a eu lieu avec le couvercles de plaque.

AVERTISSEMENT : Si l'antigène n'est pas ajouté à l'échantillon, l'instrument enregistre une erreur.

9. VALIDATION DU TEST

Utiliser les contrôles fournis à chaque session.

Si le résultat n'est pas celui escompté, contacter le service clientèle.

Tél : 0039 0577 319554
courriel : scientificsupport@diesse.it;
: customercare@diesse.it

10. INTERPRÉTATION DU TEST

L'outil fournit le résultat en titre.

Le test sur l'échantillon peut être interprété comme suit :

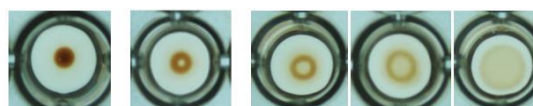
POSITIF : lorsque le résultat est $\geq 1/80$

NÉGATIF : lorsque le résultat est $< 1/80$

Il est conseillé de vérifier visuellement les résultats obtenus pour confirmer le rapport (en particulier dans le cas d'un résultat NÉG < 1/80).

En l'absence d'agglutination, les érythrocytes sédimentent, formant un bouton compact au centre du puits.

En cas d'agglutination, les érythrocytes sédimentent, formant une couche diffuse et homogène au fond du puits et/ou une structure annulaire caractéristique.



Négatif NÉG < 1/80

Positif: $\geq 1/80$

L'agglutination des cellules testées et l'absence simultanée d'agglutination des cellules de contrôle indiquent la présence d'anticorps anti-*Treponema pallidum*.

Les cellules de contrôle sédimentent en formant un bouton particulièrement compact ; si leur agglutination se produit, le test n'est pas valable.

La présence d'un bouton compact d'érythrocytes sédimentés sur le fond est interprétée comme un résultat négatif.

11. LIMITES DU TEST

Le produit ne doit être utilisé que par du personnel de laboratoire professionnel.

Le test n'est pas applicable aux échantillons autres que le sérum. Le test ne s'applique qu'à l'instrument AUTO-DAT (RÉF 26001).

Les tests tréponémiques deviennent positifs 5 à 15 jours après l'apparition des symptômes. Il n'existe pas de test unique ou de norme de référence pour chaque stade de la maladie.

Aucun test d'héماغglutination sur le sérum ne permet de distinguer les anticorps provenant d'infections causées par *Treponema pallidum* de ceux provenant d'infections causées par d'autres agents pathogènes tréponémiques.

Toutes les valeurs obtenues doivent être interprétées avec soin, sans négliger les autres indicateurs relatifs au même patient.

En effet, le test ne peut être utilisé seul pour un diagnostic clinique et le résultat obtenu doit toujours être évalué avec les données de l'histoire du patient et/ou d'autres investigations diagnostiques.

12. PLAGE DE MESURE

Plage de mesure : NÉG - 1/20480 (Titre)

13. SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

3 échantillons ont été testés (1 négatif, 1 faiblement positif et 1 fortement positif) auxquels les interférents suivants ont été ajoutés :

Facteur Rhumatoïde (44 - 220 IU/ml)
Bilirubine (4,5 mg/dl - 45 mg/dl)
Triglycérides (250 mg/dl - 1500 mg/dl)
Hémoglobine (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)

La présence des substances interférentes susmentionnées dans le sérum à tester ne modifie pas le résultat du test.

14. CROSS-RÉACTIFS

18 échantillons ont été testés, positifs pour *Borrelia* (3), le virus de l'herpès (3), *Toxoplasme* (3), *Epstein-Barr* (3), *Cytomégalovirus* (3), *Rubella* (3).

Aucune réaction croisée significative n'a été détectée, à l'exception du *Epstein-Barr* virus.

15. ÉTUDES COMPARATIVES

Dans un essai, 220 échantillons ont été analysés avec des kits DIESSE et un autre kit commercial.

Voici un aperçu des données expérimentales :

		Référence		
		+	-	Total
DIESSE	+	127	0	127
	-	0	93	93
	Total	127	93	220

Pourcentage global d'accord = 100.0% CI_{95%} : 93.3-100.0

Pourcentage d'accord positif (~sensibilité diagnostique) = 100,0 % IC_{95%} : 97.1-100.0

Pourcentage d'accord négatif (~spécificité diagnostique) = 100,0% IC_{95%} : 96,0-99,9

Valeur prédictive positive (PPV) = 100,0 % IC_{95%} : 100.0-100.0

Valeur prédictive négative (VPN) = 100,0 % IC_{95%} : 100.0-100.0

Le degré de concordance entre les deux méthodes est excellent avec une valeur K (coefficient de Cohen) de 1,00.

16. PRÉCISION ET RÉPÉTABILITÉ

La précision et la répétabilité ont été évaluées sur des répliques d'échantillons négatifs et positifs, dans trois lots différents, avec différents opérateurs effectuant le test, à des jours différents et avec des instruments différents.

Tous les résultats obtenus se situaient dans les critères d'acceptation (Accord % ≥ 95 % entre les résultats attendus et obtenus), ce qui démontre la précision et la répétabilité de la méthode.

18. BIBLIOGRAPHIE

- I. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005 Jan;16(1):45-51. doi : 10.1155/2005/597580. PMID : 18159528 ; PMCID : PMC2095002.
- II. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Livre)
- III. WHO guidelines for the treatment of *Treponema pallidum* (Syphilis) (201).
- IV. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočník M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021

Mar;35(3):574-588. doi : 10.1111/jdv.16946. Epub 2020 Oct 22. PMID : 33094521.

- V. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol.* 2015 Feb;22(2):137-47. doi : 10.1128/CVI.00681-14. Epub 2014 Nov 26. PMID : 25428245 ; PMCID : PMC4308867.
- VI. CLSI H18-A3 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens ; Approved Guideline - Third Edition. Vol. 24 N. 38

19. SIGNALISATION D'INCIDENT

Si un incident grave s'est produit en relation avec cet appareil sur le territoire de l'Union européenne, le signaler sans délai au fabricant et à l'autorité compétente de votre État membre.

20. RÉSUMÉ DE LA SÉCURITÉ ET DES PERFORMANCES

Ce document, qui sera disponible dans la base de données EUDAMED (lorsqu'elle sera entièrement mise en œuvre et opérationnelle), fait partie de la documentation technique et peut être demandé au fabricant.



GEBRAUCHSANWEISUNG

TPHA-DAT ADVANCED

Nur zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik

1. VERWENDUNGSZWECK

TPHA-DAT ADVANCED (REF 26041) ist ein Hämagglutinationstest für den semi-quantitativen Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Treponema pallidum*.

Der Test wird mit Humanserum durch passive Hämagglutination mit dem AUTO-DAT Gerät (REF 26001) durchgeführt. Das Kit dient zur Bestimmung der Exposition gegenüber einer *Treponema pallidum*-Infektion und als Hilfsmittel bei der Diagnose von Syphilis.

Der Test ist nicht dazu bestimmt, die Exposition gegenüber einer *Treponema pallidum*-Infektion in Blut, Blutbestandteilen, Zellen, Geweben, Organen oder Derivaten davon nachzuweisen, um deren Eignung für Transfusionen, Transplantationen oder Zellverabreichungen zu beurteilen.

Er sollte nur von professionellem Laborpersonal verwendet werden.

2. EINFÜHRUNG

Die Syphilis, die durch Spirochäten der Art *Treponema pallidum* (subsp. *pallidum*) verursacht wird, ist eine chronische Infektion mit vielen verschiedenen klinischen Erscheinungsformen, die in unterschiedlichen Phasen auftreten. Diese systemische Infektionskrankheit wird in der Regel durch direkten sexuellen Kontakt übertragen und zeigt treponemhaltige Läsionen. Die einzigen bekannten Wirte sind menschliche Wesen.

Für die direkte und indirekte Diagnose der Syphilis stehen zahlreiche Tests zur Verfügung, aber es gibt noch keinen optimalen Test.

Zu den direkten Diagnosemethoden gehören der Nachweis von *T. pallidum* durch mikroskopische Untersuchung von Flüssigkeit oder Abstrichen von Läsionen, die histologische Untersuchung von Gewebe oder Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die indirekte Diagnose basiert auf serologischen Tests zum Nachweis von Antikörpern. Serologische Tests lassen sich in zwei Kategorien einteilen:

1. nicht-treponemale Screening-Tests
2. bestätigende Treponemaltests

Treponemal-Tests sind spezifische Tests für Syphilis, da sie spezifische Antikörper gegen *Treponema pallidum*-Antigene nachweisen. Im Allgemeinen werden diese Tests nicht zur Beurteilung des Ansprechens auf die Behandlung verwendet, da die Reaktivität während des gesamten Lebens des Patienten anhält.

Die Diagnose muss auf der Korrelation der Testergebnisse mit anderen klinischen Befunden beruhen.

3. PRINZIP DER METHODE

Der Test beruht auf dem Prinzip der Hämagglutination.

Spezifische Antikörper im Serum des Patienten binden sich an Treponemen-Antigene (Nichols-Stamm), die an Vogel-Erythrozyten gebunden sind.

Im Falle einer Zellagglutination ist die Reaktion positiv. Die Reaktion ist negativ, wenn das Aggregat die Form eines kompakten Knopfes hat.

Der Test wird mit dem AUTO-DAT-Gerät (REF 26001) durchgeführt, das das Bild der stattgefundenen Reaktion aufnimmt, analysiert und ein auf der Grundlage eines spezifischen Algorithmus berechnetes Ergebnis liefert und ausdrückt.

Die Ergebnisse werden als Titel ausgedrückt, und es ist möglich, den erhaltenen Titel visuell zu bestätigen.

4. VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK GEEIGNET.

Dieses Kit enthält Materialien menschlichen Ursprungs, die sowohl auf HBsAg als auch auf Anti-HIV-1-, Anti-HIV-2- und Anti-HCV-Antikörper getestet und für negativ befunden wurden. Da kein diagnostischer Test eine vollständige Garantie für das Nichtvorhandensein von Infektionserregern bieten kann, muss jedes Material menschlichen Ursprungs als potenziell infiziert angesehen werden. Alle Reagenzien und Proben müssen gemäß den im Labor üblichen Sicherheitsvorschriften gehandhabt werden.

Entsorgung von Rückständen: Verwendete Proben und Reagenzien sind wie infizierte Rückstände zu behandeln und dann gemäß den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Warnungen zur persönlichen Sicherheit

1. Nicht mit dem Mund pipettieren.
2. Verwenden Sie beim Umgang mit den Proben Einweghandschuhe und einen Augenschutz.
3. Waschen Sie sich nach dem Test gründlich die Hände.
4. Bezüglich der Sicherheitseigenschaften der im Kit enthaltenen Reagenzien verweisen wir auf das Sicherheitsdatenblatt (verfügbar auf der DIESSE-Website: www.diesse.it)
5. Verschüttetes, möglicherweise infiziertes Material muss sofort mit saugfähigem Papier entfernt werden, und der verunreinigte Bereich muss dekontaminiert werden, z. B. mit 1%igem Natriumhypochlorit, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Wenn eine Säure vorhanden ist, darf Natriumhypochlorit erst verwendet werden, wenn der Bereich getrocknet ist.
Alle Materialien, die zur Dekontaminierung von versehentlich verschütteten Stoffen verwendet werden, einschließlich Handschuhe, müssen als potenziell infektiöser Abfall entsorgt werden.
Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten, dürfen nicht autoklaviert werden.

Analytische Warnhinweise

Bringen Sie die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C).

1. Der Test muss in Verbindung mit dem AUTO-DAT-Gerät (REF 26001) unter strikter Beachtung der

Gebrauchsanweisung und des Benutzerhandbuchs des Geräts durchgeführt werden.

2. Ändern Sie das Testverfahren nicht. Ersetzen Sie Reagenzien nicht durch solche anderer Lieferanten oder anderer Chargen, es sei denn, es ist ausdrücklich angegeben, dass das Reagenz zwischen den Chargen austauschbar ist.
3. Prüfen Sie, ob das Gerät richtig eingestellt ist (siehe Benutzerhandbuch).
4. Vermeiden Sie die Verwendung von selbstabtauenden Gefriergeräten für die Probenlagerung.
5. Verwenden Sie keine hämolysierten, lipämischen oder ikterischen Proben mit einer höheren Konzentration an Störsubstanzen als im Test (gemäß den Angaben im Kapitel „Analytische Spezifität“).
6. Verwenden Sie das Gerät nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
7. Nach Gebrauch die Reagenzien bei 2-8°C lagern.
8. Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien, da dies die Gültigkeit des Produkts beeinträchtigt und zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann.

5. ZUSAMMENSETZUNG DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Der Kit ist ausreichend für 50 Bestimmungen

TESTZELLEN

CELLULE TEST

3 x 4 mL

Inhalt: mit Treponema pallidum-Antigen sensibilisierte Geflügel-Erythrozyten.

CONTROL CELLS

KONTROLLZELLEN

1 x 4 mL

Inhalt: nicht sensibilisierte Geflügel-Erythrozyten.

Achtung! Lagern Sie die Fläschchen aufrecht, wenn Sie sie nicht verwenden. Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen. Nicht heftig schütteln.

SAMPLE DILUENT

PROBENVERDÜNNER

1 x 13 mL

Inhalt: Kochsalzlösung mit unspezifischen Reaktionshemmern.

CONTROL +

POSITIVE KONTROLLE

1 x 0,3 mL

Inhalt: verdünntes Humanserum mit Anti-Treponema pallidum-Antikörpern. Flüssig, gebrauchsfertig.

CONTROL -

NEGATIVE KONTROLLE

1 x 0,3 mL

Inhalt: Tiereserum (Kaninchen), das keine Anti-Treponema pallidum-Antikörper enthält. Flüssig, gebrauchsfertig

SONSTIGES ERFORDERLICHES, ABER NICHT BEREITGESTELLTES MATERIAL:

- AUTO-DAT Instrument (REF 26001)
- AUTO-DAT MICROPLATES TPHA (REF 26004)

- Mikropipetten, mit denen sich Volumina von 5-100 µl genau entnehmen lassen.
- Einweghandschuhe
- Behälter für die Sammlung von potenziell infiziertem Material

6. LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Die Reagenzien müssen bei 2/8°C gelagert werden

Nach dem ersten Gebrauch müssen die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur gelagert werden.

Das Verfallsdatum ist auf jedem Bestandteil und auf dem äußeren Verpackungsetikett aufgedruckt.

Die Stabilität der Reagenzien ändert sich nach dem Öffnen der Flasche nicht, solange der Benutzer darauf achtet, das Produkt vor möglicher mikrobieller Kontamination zu schützen.

7. ART DER PROBEN UND LAGERUNG

Bei der Probe handelt es sich um Serum, das aus durch Venenpunktion entnommenem Blut gewonnen und gemäß den Standardlaborverfahren behandelt wird.

Gemäß der CLSI-Richtlinie H18-A3 müssen die zu analysierenden Serumproben vor der Zentrifugation koaguliert werden; die spontane und vollständige Koagulation erfolgt normalerweise innerhalb von 30-60 Minuten bei 22°C-25°C. Es wird empfohlen, das Serum durch Zentrifugation so schnell wie möglich von den Zellen zu trennen, wobei die maximale Zeitspanne 2 Stunden ab dem Zeitpunkt der Entnahme beträgt. Frisches Serum ist bei 2/8°C 6 Tage lang haltbar; bei längerer Lagerung sollte es bei -20°C für mindestens 11 Monate eingefroren werden.

Die Probe kann maximal 3 Mal aufgetaut werden.

Vermeiden Sie die Verwendung von selbstabtauenden Gefriergeräten für die Probenlagerung. Nach dem Auftauen die Probe vor der Dosierung sorgfältig schütteln.

Die Hitzeinaktivierung kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Qualität der Probe kann durch mikrobielle Verunreinigungen stark beeinträchtigt werden, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann.

8. VERFAHREN

Die Bewertung erfolgt durch Beobachtung der Agglutination der Probe bei den Verdünnungen 1/80, 1/640 und 1/5120. Verwenden Sie zum Vorverdünnen der Proben die Vertiefungen in den Reihen A und E und befolgen Sie dabei die nachstehenden Anweisungen.

1. 125 µl des Probenverdünnungsmittels in Vertiefung A1 und 35 µl des Probenverdünnungsmittels in die Vertiefungen C1 und D1 geben.
2. 5 µl der Probe in die Vertiefung A1 geben. Achten Sie darauf, keine zellulären Bestandteile zu übertragen. **Homogenisieren Sie die Lösung, wobei die Bildung von Blasen zu vermeiden ist.**
3. Nehmen Sie 35 µl der Lösung in A1 und übertragen Sie sie in Vertiefung B1. **Vermeiden Sie die Bildung von Blasen.**
4. Nehmen Sie 5 µl der Lösung in A1 und übertragen Sie sie in die Vertiefung C1. **Gründlich homogenisieren.**
5. Nehmen Sie 5 µl der Lösung in C1 und übertragen Sie sie in die Vertiefung D1. **Gründlich homogenisieren und 5 µl der Lösung verwerfen.**

6. 55 µl aus Vertiefung A1 verwerfen.
7. Wiederholen Sie die gleichen Schritte für die zweite Probe unter Verwendung der Vertiefungen E1 bis H1 und der Spalten 2 bis 12 für die anderen Proben.

HINWEIS: Die Positiv- und Negativkontrollen werden gebrauchsfertig geliefert und müssen nicht vorverdünnt werden. Sie müssen bei jeder Sitzung wie unten beschrieben verwendet werden.

- a) 35 µl des Probenverdünnungsmittels in C und D hinzufügen
- b) Fügen Sie 35 µl der Kontrolle (positiv oder negativ) in A und B hinzu.
- c) 5 µl der Kontrolle (positiv oder negativ) in C hinzufügen. **Homogenisieren, ohne dass sich Blasen bilden.**
- d) 5 µl aus C entnehmen und in Vertiefung D übertragen. **Gründlich homogenisieren und 5 µl der Lösung verwerfen.**
- e) Führen Sie die gleichen Schritte für die andere Kontrolle in den Vertiefungen E bis H durch.

Sobald die Verdünnungen für Proben und Kontrollen hergestellt sind, fügen Sie die Reagenzien hinzu:

8. 75 µl KONTROLLZELLEN in A und E hinzufügen.
9. 75 µl TESTZELLEN in die anderen Vertiefungen geben.

Schema der Probenabgabe

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
SAMPLE	A	125µl DILUENT +5µl PROBE	VERWERFE 55µl	+75µl CONTROL CELLS
	B	35µl A1		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl A1		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	VERWERFE 5µl	+75µl TEST CELLS

Schema für die Abgabe der Kontrollen

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
CONTROL +	A	+35µl CONTROL +		+75µl CONTROL CELLS
	B	+35µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	5µl VERWERFEN	+75µl TEST CELLS
CONTROL -	E	+35µl CONTROL -		+75µl CONTROL CELLS
	F	+35µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	G	35µl DILUENT +5µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	H	35µl DILUENT +5µl G1	5µl VERWERFEN	+75µl TEST CELLS

Nach der Verdünnung und Zugabe der Reagenzien legen Sie die Platte in das AUTO-DAT-Gerät (REF 26001) und folgen den Anweisungen des Geräts.

Wenn das Gerät besetzt ist, kann die Testinkubation bei Raumtemperatur auf einem vibrationsfreien Tisch durchgeführt werden. In diesem Fall setzen Sie die Mikroplatte nach 60

Minuten Inkubation in das AUTO-DAT-Gerät (REF. 26001) mit äußerster Sorgfalt, um unbeabsichtigte Stöße zu vermeiden. Am Ende der Analyse nehmen Sie die Platten aus dem Gerät und decken die Vertiefungen, in denen die Reaktion stattgefunden hat, mit den Plattenabdeckungen ab.

WARNUNG: Wenn der Probe kein Antigen zugesetzt wird, meldet das Gerät einen Fehler.

9. TESTVALIDIERUNG

Verwenden Sie die bei jeder Sitzung bereitgestellten Kontrollen. Wenn das Ergebnis anders ausfällt als erwartet, wenden Sie sich bitte an den Kundendienst.

Tel: 0039 0577 319554

E-Mail: scientificsupport@diesse.it
customercare@diesse.it

10. INTERPRETATION DES TESTS

Das Instrument liefert das Ergebnis im Titel.

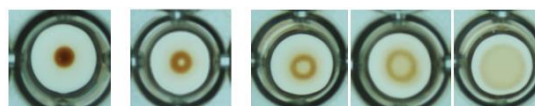
Der Test an der Probe kann wie folgt interpretiert werden:

POSITIV: wenn das Ergebnis $\geq 1/80$ ist

NEGATIV: wenn das Ergebnis $< 1/80$ ist

Es ist ratsam, die erzielten Ergebnisse visuell zu überprüfen, um den Bericht zu bestätigen (insbesondere im Falle eines NEG-Ergebnisses $< 1/80$).

Bei fehlender Agglutination sedimentieren die Erythrozyten und bilden einen kompakten Knopf in der Mitte der Vertiefung. Im Falle einer Agglutination sedimentieren die Erythrozyten und bilden eine homogene, diffuse Schicht auf dem Boden der Vertiefung und/oder bilden eine charakteristische Ringstruktur.



Negativ NEG $< 1/80$

Positiv: $\geq 1/80$

Die Agglutination von Testzellen und die gleichzeitige Abwesenheit einer Agglutination von Kontrollzellen weist auf das Vorhandensein von Antikörpern Anti-*Treponema pallidum* hin. Die Kontrollzellen sedimentieren und bilden einen besonders kompakten Knopf; wenn sie verklumpen, ist der Test ungültig. Das Vorhandensein eines kompakten Erythrozytenknopfes, der sich am Boden absetzt, wird als negatives Ergebnis gewertet.

11. GRENZEN DES TESTS

Das Produkt sollte nur von professionellem Laborpersonal verwendet werden.

Der Test ist nicht auf andere Proben als Serum anwendbar.

Der Test ist nur für das AUTO-DAT-Gerät (REF 26001) anwendbar.

Treponemaltests sind 5-15 Tage nach Auftreten der Symptome positiv. Es gibt keinen einzigen Test oder Referenzstandard für jedes Stadium der Krankheit.

Kein Hämagglutinationstest mit Serum ist in der Lage, Antikörper aus Infektionen, die durch *Treponema pallidum* verursacht wurden, von solchen zu unterscheiden, die aus Infektionen stammen, die durch andere treponemale Erreger verursacht wurden.

Alle ermittelten Werte müssen sorgfältig interpretiert werden, ohne andere Indikatoren, die denselben Patienten betreffen, außer Acht zu lassen.

Der Test kann nicht allein für eine klinische Diagnose verwendet werden, und das Ergebnis muss immer zusammen mit Daten aus der Krankengeschichte und/oder anderen diagnostischen Untersuchungen bewertet werden.

12. MESSBEREICH

Messbereich: NEG - 1/20480 (Titel)

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden 3 Proben getestet (1 Negativ, 1 Niedrig-Positiv und 1 Hoch-Positiv), denen die folgenden Störstoffe zugesetzt wurden:

Rheumafaktor (44 - 220 IU/ml)

Bilirubin (4,5 mg/dl - 45 mg/dl)

Triglyzeride (250 mg/dl - 1500 mg/dl)

Hämoglobin (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)

Das Vorhandensein der oben genannten Störsubstanzen im Testserum verändert das Testergebnis nicht.

14. KREUZREAKTIONEN

18 Proben wurden getestet, positiv auf Borrelien (3), Herpesviren (3), Toxoplasma (3), Epstein-Barr (3), Cytomegalovirus (3), Röteln (3).

Mit Ausnahme des Epstein-Barr-Virus wurden keine signifikanten Kreuzreaktionen festgestellt.

15. VERGLEICHENDE STUDIEN

In einem Versuch wurden 220 Proben mit Diesse-Kits und einem anderen kommerziellen Kit analysiert.

Es folgt ein Überblick über die experimentellen Daten:

		Referenz		
		+	-	Insgesamt
Diesse	+	127	0	127
	-	0	93	93
	Insgesamt	127	93	220

Prozentuale Gesamt-Übereinstimmung = 100.0% CI_{95%}: 93.3-100.0

Prozentuale positive Übereinstimmung (~Diagnostische Sensitivität) = 100.0% CI_{95%}: 97.1-100.0

Prozentuale negative Übereinstimmung (~Diagnostische Spezifität) = 100.0% CI_{95%}: 96.0-99.9

Positiver prädiktiver Wert (PPV) = 100.0% CI_{95%}: 100.0-100.0

Negativer prädiktiver Wert (NPV) = 100.0% CI_{95%}: 100.0-100.0

Der Grad der Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden ist mit einem K-Wert (Cohen's Coefficient) von 1,00 ausgezeichnet.

16. PRÄZISION UND WIEDERHOLBARKEIT

Genauigkeit und Wiederholbarkeit wurden an Wiederholungen negativer und positiver Proben aus drei verschiedenen Chargen, mit verschiedenen Bedienern, die den Test an verschiedenen Tagen und mit verschiedenen Geräten durchführten, bewertet. Alle erzielten Ergebnisse lagen innerhalb der Akzeptanzkriterien (Übereinstimmung % $\geq$ 95 % zwischen erwarteten und erzielten Ergebnissen), was die Genauigkeit und Wiederholbarkeit der Methode belegt.

18. BIBLIOGRAPHIE

- I. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Jan;16(1):45-51. doi: 10.1155/2005/597580. PMID: 18159528; PMCID: PMC2095002.
- II. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Buch)
- III. WHO guidelines for the treatment of Treponema pallidum (Syphilis) (201).
- IV. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočník M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021 Mar;35(3):574-588. doi: 10.1111/jdv.16946. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094521.
- V. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol. 2015 Feb;22(2):137-47. doi: 10.1128/CVI.00681-14. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25428245; PMCID: PMC4308867.
- VI. CLSI H18-A3 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline — Third Edition. Vol. 24 No. 38

19. BERICHTERSTATTUNG ÜBER VORFÄLLE

Wenn sich im Zusammenhang mit diesem Gerät im Marktgebiet der Europäischen Union ein schwerer Unfall ereignet hat, melden Sie dies bitte unverzüglich dem Hersteller und der zuständigen Behörde Ihres Mitgliedstaates.

20. ZUSAMMENFASSUNG DER SICHERHEIT UND LEISTUNG

Dieses Dokument, das in der EUDAMED-Datenbank zur Verfügung gestellt wird (sobald sie vollständig implementiert und funktionsfähig ist), ist Teil der technischen Dokumentation und kann beim Hersteller angefordert werden.



NÁVOD NA POUŽITÍ

TPHA-DAT ADVANCED

Pouze pro diagnostické použití in vitro

1. URČENÉ POUŽITÍ

TPHA-DAT ADVANCED (REF 26041) je hemaglutinační test pro semikvantitativní detekci specifických protilátek proti *Treponema pallidum*.

Test se provádí na lidském séru pasivní hemaglutinací pomocí přístroje AUTO-DAT (REF 26001). Sada je určena ke stanovení expozice infekci způsobené *Treponema pallidum* a k použití jako pomůcka při diagnostice syfilidy.

Test není určen ke zjištění expozice infekci *Treponema pallidum* v krvi, krevních složkách, buňkách, tkáních, orgánech nebo jejich derivátech za účelem posouzení jejich vhodnosti pro transfuzi, transplantaci nebo podání buněk. Musí jej používat pouze odborní pracovníci laboratoře.

2. ÚVOD

Syfilida, způsobená spirochetami *Treponema pallidum* (subsp. *pallidum*), je chronická infekce s mnoha různými klinickými projevy probíhajícími v odlišných fázích. Obecně se toto systémové infekční onemocnění šíří přímým pohlavním stykem a projevuje se lézemi obsahujícími treponemy. Jedinými známými hostiteli jsou lidé.

Pro přímou i nepřímou diagnostiku syfilidy je k dispozici mnoho testů, ale dosud neexistuje jediný optimální test.

Přímé diagnostické metody zahrnují detekci *T. pallidum* pomocí mikroskopického vyšetření tekutiny nebo stěrů z lézí, histologického vyšetření tkáně nebo metod amplifikace nukleových kyselin, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR).

Nepřímá diagnostika je založena na sérologických testech na zjištění protilátek. Sérologické testy se dělí do dvou kategorií:

1. netreponemové screeningové testy
2. konfirmační treponemové testy

Treponemové testy jsou specifické testy na syfilidu, protože detekují specifické protilátky proti antigenům *Treponema pallidum*. Obecně se tyto testy nepoužívají k posouzení odpovědi na léčbu vzhledem k přetrvávající reaktivitě po celý život pacienta.

Diagnóza musí být založena na korelaci výsledků testů s dalšími klinickými nálezy.

3. PRINCIP METODY

Test je založen na principu hemaglutinace.

Specifické protilátky v séru pacienta se vážou na treponemové antigeny (Nicholsův kmen) navázané na ptačí erytrocyty.

Reakce je pozitivní v případě aglutinace buněk. Reakce je záporná, pokud má agregát tvar kompaktního knoflíku.

Test se provádí na přístroji AUTO-DAT (REF 26001), který zachytí obraz proběhlé reakce, analyzuje jej, poskytne a vytiskne výsledek vypočtený na základě specifického algoritmu.

Výsledky jsou vyjádřeny v titrech a získaný titr je možné vizuálně potvrdit.

4. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

POUZE PRO DIAGNOSTIKU IN VITRO.

Tato sada obsahuje materiály lidského původu, které byly testovány a shledány negativními v testech na HBsAg a protilátky anti-HIV-1, anti-HIV-2 a anti-HCV. Vzhledem k tomu, že žádný diagnostický test nemůže poskytnout úplnou záruku nepřítomnosti infekčních agens, musí být jakýkoli materiál lidského původu považován za potenciálně infikovaný. Se všemi činidly a vzorky se musí zacházet v souladu s bezpečnostními pravidly obvyklými v laboratoři.

Likvidace zbytků: s použitými vzorky a činidly je třeba zacházet jako s infekčními zbytky a poté je zlikvidovat podle platných předpisů.

Upozornění týkající se bezpečnosti personálu

1. Nepipetujte ústy.
2. Při manipulaci se vzorky používejte jednorázové rukavice a ochranu očí.
3. Po dokončení testu si důkladně umyjte ruce.
4. Bezpečnostní charakteristiky činidel obsažených v sadě naleznete v bezpečnostním listu (k dispozici na webových stránkách společnosti DIESSE: www.diesse.it)
5. Jakékoli rozlití potenciálně infikovaných materiálů musí být okamžitě odstraněno pomocí absorpčního papíru a znečištěný prostor musí být před pokračováním v práci dekontaminován, např. 1% chlornanem sodným. Pokud je přítomna kyselina, chlornan sodný nesmí být použit dříve, než bude zóna vysušena. Veškeré materiály použité k dekontaminaci náhodně rozlitych látek, včetně rukavic, by měly být zlikvidovány jako potenciálně infekční odpad. Materiály s obsahem chlornanu sodného nevracíte do autoklávu.

Opatření pro správné provedení testu

Před použitím uveďte činidla na pokojovou teplotu (18-30 °C).

1. Test musí být používán ve spojení s přístrojem AUTO-DAT (REF 26001), přičemž je třeba přesně dodržovat návod k použití a uživatelskou příručku k přístroji.
2. Postup testu neupravujte. Nezaměňujte činidla za činidla od jiných dodavatelů nebo jiných šarží, pokud není výslovně uvedeno, že je činidlo mezi šaržemi zaměnitelné.
3. Zkontrolujte, zda je přístroj správně nastaven (viz uživatelská příručka).
4. Vyhněte se používání samoodmrazovacích mrazniček pro skladování vzorků.
5. Nepoužívejte hemolyzované, lipaemické a ikterické vzorky s vyšší koncentrací interferenčních látek, než je testovaná koncentrace (podle údajů v kapitole „Analytická specifita“).
6. Přístroj nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
7. Po použití skladujte reagenty při teplotě 2-8 °C.
8. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentů, protože to snižuje platnost výrobku a může vést k nesprávným výsledkům.

5. SLOŽENÍ SADY A PŘÍPRAVA ČINIDEL

Sada vystačí na 50 stanovení

TEST CELLS

BUNĚČNÉ TESTY

3 x 4 mL

Obsah: ptačí erytrocyty senzibilizované antigenem *Treponema pallidum*.

CONTROL CELLS

KONTROLNÍ BUNKY

1 x 4 mL

Obsah: nesenzibilizované ptačí erytrocyty.

Upozornění: Nepoužívané lahvičky skladujte ve svislé poloze. Před použitím uveďte lahvičky do pokojové teploty. Netřepteje silně.

SAMPLE DILUENT

VZOREK ŘEDIDLA

1 x 13 mL

Obsah: fyziologický roztok obsahující nespecifické inhibitory reakce.

CONTROL +

POZITIVNÍ KONTROLA

1 x 0.3 mL

Obsah: zředěné lidské sérum obsahující protilátky proti *Treponema pallidum*. Tekuté, připravené k použití.

CONTROL -

NEGATIVNÍ KONTROLA

1 x 0.3 mL

Obsah: zvířecí sérum (králík) neobsahující protilátky proti *Treponema pallidum*. Tekuté, připravené k použití.

DALŠÍ POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ:

- Přístroj AUTO-DAT (REF 26001)
- AUTO-DAT MICROPLATES TPHA (REF 26004)
- Mikropipety schopné přesně odebírat objemy 5-100 µl.
- Jednorázové rukavice
- Nádoby pro odběr potenciálně infikovaných materiálů.

6. SKLADOVÁNÍ A STABILITA ČINIDEL

Činidla musí být skladovány při teplotě 2/8 °C.

Po prvním použití by měly být mikrodestičky skladovány při pokojové teplotě.

Datum použitelnosti je vytištěno na každé složce a na vnějším štítku balení.

Stabilita reagentů se po otevření lahvičky nemění, pokud uživatel dbá na to, aby byl výrobek chráněn před možnou mikrobiální kontaminací.

7. TYP VZORKŮ A SKLADOVÁNÍ

Typem vzorku je sérum získané z krve odebrané ze žíly a zpracované podle standardních laboratorních postupů.

Podle pokynu CLSI H18-A3 musí být vzorky séra určené k analýze před centrifugací sráženy; spontánní a úplná koagulace obvykle probíhá během 30-60 minut při 22 °C-25 °C. Doporučuje

se, aby sérum bylo co nejdříve fyzicky odděleno centrifugací od kontaktu s buňkami s maximálním časovým limitem 2 hodiny od odběru.

Čerstvé sérum lze uchovávat po dobu 6 dnů při teplotě 2/8 °C; pro delší skladování je třeba jej zmrazit při -20 °C po dobu nejméně 11 měsíců.

Vzorek lze rozmrazit maximálně 3krát.

Vyhnete se používání samoodmrazovacích mrazniček pro skladování vzorků. Po rozmrazení vzorek před analýzou pečlivě protřepejte.

Teplná inaktivace může vést k chybným výsledkům.

Kvalita vzorku může být vážně ovlivněna mikrobiální kontaminací, která může vést k chybným výsledkům.

8. POSTUP

Hodnocení se provádí pozorováním aglutinace vzorku při ředění 1/80, 1/640 a 1/5120. Pro předředění vzorků použijte jamky v řádcích A a E podle níže uvedeného postupu.

1. Přidejte 125 µl ředidla vzorku do jamky A1 a 35 µl ředidla vzorku do jamek C1 a D1.
2. Přidejte 5 µl vzorku do jamky A1. Dejte pozor, abyste nepřenesli žádné buněčné elementy. **Roztok homogenizujte, aby se netvořily bubliny.**
3. Odeberte 35 µl roztoku z jamky A1 a přeneste do jamky B1. **Vyhnete se tvorbě bublin.**
4. Odeberte 5 µl roztoku z jamky A1 a přeneste do jamky C1. **Důkladně homogenizujte.**
5. Odeberte 5 µl roztoku z jamky C1 a přeneste do jamky D1. **Důkladně homogenizujte a 5 µl roztoku vyhodte.**
6. Vyhodte 55 µl z jamky A1.
7. Stejně kroky opakujte pro druhý vzorek s použitím jamek E1 až H1 a sloupců 2 až 12 pro ostatní vzorky.

POZNÁMKA: Pozitivní a negativní kontroly se dodávají připravené k použití a nevyžadují předběžné ředění. Musí být použity při každé relaci, jak je popsáno níže.

- a) Přidejte 35 µl ředidla pro vzorky v C a D
- b) Přidejte 35 µl kontroly (pozitivní nebo negativní) do A a B
- c) Přidejte 5 µl kontroly (pozitivní nebo negativní) do C. **Homogenizujte bez tvorby bublin.**
- d) Odeberte 5 µl z C a přeneste do jamky D. **Důkladně homogenizujte a 5 µl roztoku vyhodte.**
- e) Proveďte stejné kroky pro druhou kontrolu s použitím jamek E až H.

Po provedení ředění pro vzorky a kontroly pokračujte v přidávání činidel:

8. Přidejte 75 µl KONTROLNÍCH BUNĚK do A a E.
9. Do ostatních jamek přidejte 75 µl TESTOVACÍCH BUNĚK.

Schéma dávkování vzorku

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
SAMPLE	A	125µl DILUENT +5µl VZOREK	DISCARD 55µl	+75µl CONTROL CELLS
	B	35µl A1		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl A1		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS

Schéma dávkování kontrol

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
CONTROL +	A	+35µl CONTROL +		+75µl CONTROL CELLS
	B	+35µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS
CONTROL -	E	+35µl CONTROL -		+75µl CONTROL CELLS
	F	+35µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	G	35µl DILUENT +5µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	H	35µl DILUENT +5µl G1	DISCARD 5µl	+75µl TEST CELLS

Po provedení ředění a přidání činidel vložte destičku do přístroje AUTO-DAT (REF 26001) a postupujte podle pokynů přístroje. Pokud je přístroj obsazen, lze inkubaci testu provést při pokojové teplotě na stole bez vibrací. V takovém případě po 60 minutách inkubace vložte mikrodestičku do přístroje AUTO-DAT (REF. 26001) s maximální opatrností a vyvarujte se náhodných otřesů. Na konci analýzy vyjměte destičku z přístroje a zakryjte reakční jamky krytem destičky.

UPOZORNĚNÍ: pokud není ke vzorku přidán antigen, přístroj zaznamená chybu.

9. VALIDACE TESTU

Při každé relaci použijte kontrolní buňky.

Pokud se výsledek liší od očekávaného, kontaktujte oddělení péče o zákazníky.

Tel: 0039 0577 319554
email: scientificsupport@diesse.it;
customercare@diesse.it

10. INTERPRETACE TESTU

Přístroj uvádí výsledek v názvu.

Test na zkušební vzorku lze interpretovat následovně:

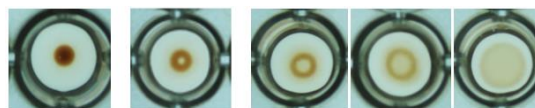
POZITIVNÍ: když je výsledek $\geq 1/80$

NEGATIVNÍ: když je výsledek $< 1/80$

Doporučuje se vizuálně zkontrolovat získané výsledky, aby se potvrdilo hlášení (zejména v případě výsledku NEG $< 1/80$).

Při absenci aglutinace erytrocyty sedimentují a tvoří kompaktní knoflík uprostřed jamky.

V případě aglutinace erytrocyty sedimentují a tvoří homogenní rozptýlenou vrstvu na dně jamky a/nebo vytvářejí charakteristickou kruhovou strukturu.



Negativní NEG $< 1/80$

Pozitivní: $\geq 1/80$

Aglutinace testovacích buněk a současná nepřítomnost aglutinace kontrolních buněk ukazuje na přítomnost protilátek anti-*Treponema pallidum*.

Kontrolní buňky sedimentují tak, aby vytvořily zvláště kompaktní knoflík; pokud dojde k aglutinaci, je test neplatný.

Přítomnost kompaktního knoflíku erytrocytů sedimentujících na dně se interpretuje jako negativní výsledek.

11. OMEZENÍ TESTU

Výrobek musí být používán pouze odborným laboratorním personálem.

Test nelze aplikovat na jiné vzorky než sérum.

Test je použitelný pouze pro přístroj AUTO-DAT (REF 26001).

Treponemové testy jsou pozitivní 5-15 dní po nástupu příznaků. Pro jednotlivé fáze onemocnění není k dispozici jediný test nebo referenční standard.

Žádný hemaglutinační test na séru nedokáže rozlišit protilátky vzniklé při infekcích způsobených *Treponema pallidum* od protilátek vzniklých při infekcích způsobených jinými treponemovými patogeny.

Všechny získané hodnoty vyžadují pečlivou interpretaci, aniž by se braly v úvahu jiné ukazatele týkající se téhož pacienta.

Ve skutečnosti nelze test použít pro stanovení klinické diagnózy samostatně a získaný výsledek je vždy třeba hodnotit společně s údaji z anamnézy pacienta a/nebo s dalšími diagnostickými vyšetřeními.

12. ROZSAH MĚŘENÍ

Rozsah měření NEG - 1/20480 (Název)

13. ANALYTICKÁ SPECIFICITA

Byly testovány tři vzorky (1 negativní, 1 nízké pozitivní a 1 vysoce pozitivní), ke kterým byly přidány následující interferenční látky:

Revmatoidní faktor (44 - 220 IU/ml)
Bilirubin (4,5 mg/dl - 45 mg/dl)
Triglyceridy (250 mg/dl - 1500 mg/dl)
Hemoglobin (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)

Přítomnost výše uvedených interferenčních látek v testovaném séru nemění výsledek testu.

14. ZKŘÍŽENÁ REAKTIVITA

Bylo testováno 18 vzorků, pozitivních na boreliu (3), herpes virus (3), toxoplasmu (3), Epstein-Barrové (3), cytomegalovirus (3), rubeolu (3).

Nebyly zjištěny žádné významné zkřížené reakce s výjimkou viru Epstein-Barrové.

15. SROVNÁVACÍ STUDIE

V jednom experimentu bylo analyzováno 220 vzorků pomocí sady Diesse a další komerční sady.

Níže jsou shrnuty údaje ze studie:

		Reference		
		+	-	Celkem
Diesse	+	127	0	127
	-	0	93	93
	Celkem	127	93	220

Celkové procento shody = 100,0% $CI_{95\%}$: 93,3-100,0

Procento pozitivní shody (~ Diagnostická citlivost) = 100,0%

$CI_{95\%}$: 97,1-100,0

Procento negativní shody: (~Diagnostická specifita) = 100,0%

$CI_{95\%}$: 96,0-99,9

Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) = 100,0% $CI_{95\%}$: 100,0-100,0

Negativní prediktivní hodnota (NPV) = 100,0% $CI_{95\%}$: 100,0-100,0

Míra shody mezi oběma metodami je vynikající s hodnotou K (Cohenův koeficient) 1,00.

16. PŘESNOST A OPAKOVATELNOST

Přesnost a opakovatelnost byly hodnoceny na replikách negativních a pozitivních vzorků, ve třech různých šaržích, s různými operátory provádějícími test, v různých dnech a s různými přístroji.

Všechny získané výsledky splňují kritéria přijatelnosti (shoda % ≥ 95 % mezi očekávanými a získanými výsledky), což prokazuje přesnost a opakovatelnost metody.

18. BIBLIOGRAFIE

- I. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Jan;16(1):45-51. doi: 10.1155/2005/597580. PMID: 18159528; PMCID: PMC2095002.
- II. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Syphilis (Book)
- III. WHO guidelines for the treatment of Treponema pallidum (Syphilis) (201).
- IV. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočník M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021 Mar;35(3):574-588. doi: 10.1111/jdv.16946. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094521.
- V. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol. 2015 Feb;22(2):137-47. doi: 10.1128/00681-14. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25428245; PMCID: PMC4308867.
- VI. CLSI H18-A3 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline — Third Edition. Svaz. 24 čís. 38

19. HLÁŠENÍ NEŽÁDOUCÍ UDÁLOSTI

Pokud došlo k vážné nehodě s tímto přístrojem na území Evropské unie, neprodleně ji nahlase výrobcí a příslušnému orgánu vašeho členského státu.

20. SHRNUÍ TÝKAJÍCÍ SE BEZPEČNOSTI A VÝKONNOSTI

Tento dokument, který bude zpřístupněn v databázi EUDAMED (až bude plně zavedena a funkční), je součástí technické dokumentace a lze si jej vyžádat od výrobce.



INSTRUCCIONES DE USO

TPHA-DAT ADVANCED

Sólo para uso diagnóstico in vitro

1. USO PREVISTO

TPHA-DAT ADVANCED (REF 26041) es una prueba de hemaglutinación para la detección semicuantitativa de anticuerpos específicos contra *Treponema pallidum*.

La prueba se realiza en suero humano por hemaglutinación pasiva utilizando el instrumento AUTO-DAT (REF 26001). El kit está destinado a determinar la exposición a la infección por *Treponema pallidum* y a utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la sífilis.

La prueba no está destinada a ser utilizada para detectar la exposición a la infección por *Treponema pallidum* en sangre, componentes sanguíneos, células, tejidos, órganos o cualquier derivado de los mismos con el fin de evaluar su idoneidad para transfusión, trasplante o administración celular.

Sólo debe ser utilizado por personal profesional de laboratorio.

2. INTRODUCCIÓN

La sífilis, causada por las espiroquetas *Treponema pallidum* (subsp. *pallidum*), es una infección crónica con muchas manifestaciones clínicas diferentes que se producen en fases distintas. Generalmente, esta enfermedad infecciosa sistémica se contrae por contacto sexual directo y presenta lesiones que contienen treponemas. Los únicos huéspedes conocidos son seres humanos.

Se dispone de muchas pruebas para el diagnóstico directo e indirecto de la sífilis, pero todavía no existe una única prueba óptima.

Los métodos de diagnóstico directo incluyen la detección de *T. pallidum* mediante el examen microscópico de fluidos o frotis de lesiones, el examen histológico de tejidos o métodos de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El diagnóstico indirecto se basa en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos. Las pruebas serológicas se dividen en dos categorías:

1. pruebas de cribado no treponémicas
2. pruebas treponémicas de confirmación

Las pruebas treponémicas son pruebas específicas para la sífilis, ya que detectan anticuerpos específicos contra antígenos del *Treponema pallidum*. Por lo general, estas pruebas no se utilizan para evaluar la respuesta al tratamiento debido a la persistencia de la reactividad a lo largo de la vida del paciente. El diagnóstico debe basarse en la correlación de los resultados de las pruebas con otros hallazgos clínicos.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba se basa en el principio de la hemaglutinación.

Los anticuerpos específicos del suero del paciente se unen a los antígenos treponémicos (cepa Nichols) adheridos a los eritrocitos aviares.

La reacción es positiva en caso de aglutinación celular. La reacción es negativa si el agregado tiene forma de botón compacto.

La prueba se aplica al instrumento AUTO-DAT (REF 26001), que capta la imagen de la reacción que se ha producido, la analiza, entrega e imprime un resultado calculado a partir de un algoritmo específico.

Los resultados se expresan en forma de título y es posible confirmar visualmente el título obtenido.

4. PRECAUCIONES

PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido analizados y han resultado negativos tanto para el HBsAg como para los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-VHC. Dado que ninguna prueba de diagnóstico puede ofrecer una garantía total de ausencia de agentes infecciosos, todo material de origen humano debe considerarse potencialmente infectado. Todos los reactivos y muestras deben manipularse de acuerdo con las normas de seguridad normalmente adoptadas en el laboratorio.

Eliminación de residuos: las muestras y los reactivos utilizados deben tratarse como residuos infectados y eliminarse de acuerdo con las disposiciones legales.

Advertencias de seguridad personal

1. No pipetear con la boca.
2. Utilizar guantes desechables y protección ocular al manipular las muestras.
3. Lávese bien las manos una vez finalizada la prueba.
4. En cuanto a las características de seguridad de los reactivos contenidos en el kit, consulte la ficha de datos de seguridad (disponible en el sitio web de DIESSE: www.diesse.it).
5. Cualquier derrame de materiales potencialmente infectados debe retirarse inmediatamente con papel absorbente y la zona contaminada debe descontaminarse, por ejemplo con hipoclorito sódico al 1%, antes de continuar el trabajo. Si hay un ácido presente, no debe utilizarse hipoclorito sódico hasta que la zona se haya secado.

Todos los materiales utilizados para descontaminar derrames accidentales, incluidos los guantes, deben desecharse como residuos potencialmente infecciosos.

No esterilizar en autoclave materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Advertencias analíticas

Llevar los reactivos a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso.

1. La prueba debe utilizarse junto con el instrumento AUTO-DAT (REF 26001), siguiendo estrictamente las instrucciones de uso y el manual del usuario del instrumento.
2. No modifique el procedimiento de prueba. No sustituya los reactivos por los de otros proveedores u otros lotes a

menos que se indique específicamente que el reactivo es intercambiable entre lotes.

3. Compruebe que el aparato está correctamente configurado (véase el manual del usuario).
4. Evite el uso de congeladores autodescongelantes para el almacenamiento de muestras.
5. No utilizar muestras hemolizadas, lipémicas, ictericas con una concentración de interferentes superior a la analizada (según las indicaciones del capítulo "Especificidad analítica").
6. No utilice el aparato después de la fecha de caducidad.
7. Tras su uso, conservar los reactivos a 2-8°C.
8. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, ya que reduce la validez del producto y puede dar lugar a resultados erróneos.

5. COMPOSICIÓN DEL KIT Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

El kit es suficiente para 50 determinaciones

TEST CELLS

CÉLULAS DE ENSAYO

3 x 4 ml

Contenido: eritrocitos aviares sensibilizados con antígeno de *Treponema pallidum*.

CONTROL CELLS

CÉLULAS DE CONTROL

1 x 4 ml

Contenido: eritrocitos aviares no sensibilizados.

Atención: Conservar los viales en posición vertical cuando no se utilicen. Llevar a temperatura ambiente antes de usar. No agitar enérgicamente.

SAMPLE DILUENT

DILUYENTE DE MUESTRAS

1 x 13 ml

Contenido: solución salina con inhibidores de reacción inespecíficos.

CONTROL +

CONTROL POSITIVO

1 x 0,3 ml

Contenido: suero humano diluido con anticuerpos anti-*Treponema pallidum*. Líquido, listo para usar.

CONTROL -

CONTROL NEGATIVO

1 x 0,3 ml

Contenido: suero animal (conejo) diluido sin anticuerpos anti-*Treponema pallidum*. Líquido, listo para usar

OTRO MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

- Instrumento AUTO-DAT (REF 26001)
- AUTO-DAT MICROPLATES TPHA (REF 26004)
- Micropipetas capaces de tomar con precisión volúmenes de 5-100 µl.
- Guantes desechables
- Contenedores para la recogida de materiales potencialmente infectados

6. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben conservarse a 2/8°C

Después del primer uso, las microplacas deben conservarse a temperatura ambiente.

La fecha de caducidad está impresa en cada componente y en la etiqueta exterior del envase.

La estabilidad de los reactivos no cambia después de abrir el frasco, siempre que el usuario tenga cuidado de mantener el producto a salvo de una posible contaminación microbiana.

7. TIPO DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

El tipo de muestra es suero obtenido de sangre extraída por venopunción y manipulado según los procedimientos estándar de laboratorio.

Según la directriz H18-A3 del CLSI, las muestras de suero para análisis deben coagularse antes de la centrifugación; la coagulación espontánea y completa se produce normalmente en 30-60 minutos a 22°C-25°C. Se recomienda separar físicamente el suero, por centrifugación, del contacto celular lo antes posible con un plazo máximo de 2 horas desde el momento de la recogida.

El suero fresco puede conservarse durante 6 días a 2/8°C; para periodos de almacenamiento más largos, congélelo a -20°C durante al menos 11 meses.

La muestra puede someterse a un máximo de 3 descongelaciones.

Evite el uso de congeladores autodescongelantes para el almacenamiento de muestras. Tras la descongelación, agitar cuidadosamente la muestra antes de la dosificación.

La inactivación por calor puede proporcionar resultados erróneos.

La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana, lo que puede dar lugar a resultados erróneos.

8. PROCEDIMIENTO

La evaluación se realiza observando la aglutinación de la muestra en las diluciones 1/80, 1/640 y 1/5120. Para prediluir las muestras, utilice los pocillos de las filas A y E, siguiendo las instrucciones siguientes.

1. Añadir 125 µl de Diluyente de Muestra al pocillo A1 y 35 µl de Diluyente de Muestra a los pocillos C1 y D1.
2. Añadir 5 µl de muestra al pocillo A1. Tenga cuidado de no transferir ningún elemento celular. **Homogeneizar la solución, evitando la formación de burbujas.**
3. Tomar 35 µl de solución en A1 y transferir al pocillo B1. **Evitar la formación de burbujas.**
4. Tomar 5 µl de solución en A1 y transferir al pocillo C1. **Homogeneizar bien.**
5. Tomar 5 µl de solución en C1 y transferir al pocillo D1. **Homogeneizar bien y desechar 5 µl de solución.**
6. Desechar 55 µl del pocillo A1.
7. Repita los mismos pasos para la segunda muestra utilizando los pocillos E1 a H1 y las columnas 2 a 12 para las demás muestras.

NOTA: Los controles positivos y negativos se suministran listos para su uso y no requieren dilución previa. Deben

utilizarse en cada sesión tal como se describe a continuación.

- Añadir 35 µl de Diluyente de Muestra en C y D
- Añadir 35 µl de Control (positivo o negativo) en A y B.
- Añadir 5 µl de Control (positivo o negativo) en C. **Homogeneizar sin formar burbujas.**
- Extraer 5 µl de C y transferir al pocillo D. **Homogeneizar bien y desechar 5 µl de solución.**
- Realice los mismos pasos para el otro Control utilizando los pocillos E a H.

Una vez realizadas las diluciones para las muestras y los controles, proceda a añadir los reactivos:

- Añadir 75 µl de CÉLULAS DE CONTROL en A y E.
- Añadir 75 µl de CÉLULAS DE PRUEBA a los otros pocillos.

Esquema de dispensación de muestras

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
SAMPLE	A	125µl DILUENT +5µl MUESTRA	DESCARTAR 55µl	+75µl CONTROL CELLS
	B	35µl A1		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl A1		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DESCARTAR 5µl	+75µl TEST CELLS

Esquema de dispensación de controles

		Step 1	Step 2	Step 3
		1	1	1
CONTROL +	A	+35µl CONTROL +		+75µl CONTROL CELLS
	B	+35µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	C	35µl DILUENT +5µl CONTROL +		+75µl TEST CELLS
	D	35µl DILUENT +5µl C1	DESCARTAR 5µl	+75µl TEST CELLS
CONTROL -	E	+35µl CONTROL -		+75µl CONTROL CELLS
	F	+35µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	G	35µl DILUENT +5µl CONTROL -		+75µl TEST CELLS
	H	35µl DILUENT +5µl G1	DESCARTAR 5µl	+75µl TEST CELLS

Una vez realizadas las diluciones y añadidos los reactivos, coloque la placa en el instrumento AUTO-DAT (REF 26001) y siga las instrucciones del instrumento.

Si el instrumento está ocupado, la incubación de la prueba puede realizarse a temperatura ambiente en un banco sin vibraciones. En este caso, tras 60 minutos de incubación, introduzca la microplaca en el instrumento AUTO-DAT (REF. 26001) con el máximo cuidado, evitando impactos accidentales. Al final del análisis, retire las placas del instrumento y cubra con los cubreplacas los pocillos en los que se produjo la reacción.

ADVERTENCIA: Si no se añade antígeno a la muestra, el instrumento registrará un error.

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBAS

Utilice los controles que se le proporcionarán en cada sesión.

Si el resultado es distinto del esperado, póngase en contacto con el Servicio de Atención al Cliente.

Tel: 0039 0577 319554
 correo scientificsupport@diesse.it
 electrónico: customercare@diesse.it

10. INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

La herramienta proporciona el resultado en el título.

La prueba de la muestra de ensayo puede interpretarse del siguiente modo:

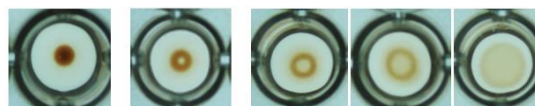
POSITIVO: cuando el resultado es $\geq 1/80$

NEGATIVO: cuando el resultado es $< 1/80$

Es aconsejable comprobar visualmente los resultados obtenidos para confirmar el informe (especialmente en el caso de un resultado NEG $< 1/80$).

En ausencia de aglutinación, los eritrocitos sedimentan formando un botón compacto en el centro del pocillo.

En caso de aglutinación, los eritrocitos sedimentan, formando una capa homogéneamente difusa en el fondo del pocillo y/o formando una estructura anular característica.



Negativo NEG $< 1/80$ Positivo: $\geq 1/80$

La aglutinación de las células de prueba y la ausencia simultánea de aglutinación de las células de control indican la presencia de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*.

Las Células de Control sedimentan formando un botón especialmente compacto; si se produce su aglutinación, la prueba no es válida.

La presencia de un botón compacto de eritrocitos sedimentados en el fondo se interpreta como un resultado negativo.

11. LIMITACIONES DE LA PRUEBA

El producto sólo debe ser utilizado por personal profesional de laboratorio.

La prueba no es aplicable a muestras distintas del suero.

La prueba sólo es aplicable al instrumento AUTO-DAT (REF 26001).

Las pruebas treponémicas dan positivo entre 5 y 15 días después de la aparición de los síntomas. No se dispone de una única prueba o norma de referencia para cada estadio de la enfermedad.

Ninguna prueba de hemoaglutinación en suero es capaz de distinguir los anticuerpos derivados de infecciones causadas por *Treponema pallidum* de los derivados de infecciones causadas por otros patógenos treponémicos.

Todos los valores obtenidos necesitan una interpretación cuidadosa sin dejar de lado otros indicadores relativos al mismo paciente.

De hecho, la prueba no puede utilizarse por sí sola para un diagnóstico clínico y el resultado obtenido debe evaluarse siempre junto con los datos de la historia clínica del paciente y/u otras investigaciones diagnósticas.

12. RANGO DE MEDIDA

Rango de medición: NEG - 1/20480 (Título)

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 3 muestras (1 Negativa, 1 Positiva Baja y 1 Positiva Alta) a las que se añadieron los siguientes interferentes:

Factor reumatoide (44 - 220 UI/ml)
Bilirrubina (4,5 mg/dl - 45 mg/dl)
Triglicéridos (250 mg/dl - 1500 mg/dl)
Hemoglobina (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)

La presencia de las sustancias interferentes mencionadas en el suero de prueba no altera el resultado de la prueba.

14. REACTIVIDAD CRUZADA

Se analizaron 18 muestras, positivas para Borrelia (3), Herpes virus (3), Toxoplasma (3), Epstein-Barr (3), Citomegalovirus (3), Rubéola (3).

No se detectaron reacciones cruzadas significativas, a excepción de virus de Epstein-Barr.

15. ESTUDIOS COMPARATIVOS

En un ensayo, se analizaron 220 muestras con kits Diesse y otro kit comercial.

A continuación se resumen los datos experimentales:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	127	0	127
	-	0	93	93
	Total	127	93	220

Overall Percent Agreement = (acuerdo porcentual general)

100,0% CI_{95%}: 93.3-100.0

Porcentaje de acuerdo positivo (~Sensibilidad diagnóstica)=

100,0% CI_{95%}: 97.1-100.0

Porcentaje de concordancia negativa (~especificidad diagnóstica) =100,0% CI_{95%}:96.0-99.9

Valor predictivo positivo (VPP) = 100,0% CI_{95%}: 100.0-100.0

Valor predictivo negativo (VPN) = 100,0% CI_{95%}: 100.0-100.0

El grado de concordancia entre los dos métodos es excelente, con un valor K (Coeficiente de Cohen) de 1,00.

16. PRECISIÓN Y REPETIBILIDAD

La precisión y la repetibilidad se evaluaron en réplicas de muestras negativas y positivas, en tres lotes diferentes, con diferentes operadores realizando la prueba, en días diferentes y con instrumentos diferentes.

Todos los resultados obtenidos se situaron dentro de los criterios de aceptación (Acuerdo % $\geq$ 95% entre los resultados esperados y los obtenidos), lo que demuestra la precisión y repetibilidad del método.

18. BIBLIOGRAFÍA

- I. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Ene;16(1):45-51. doi: 10.1155/2005/597580. PMID: 18159528; PMCID: PMC2095002.
- II. Antonio Fuertes Ortiz de Urbina Sífilis (Libro)
- III. Directrices de la OMS para el tratamiento del Treponema pallidum (Sífilis) (201).

IV. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočník M, Patel R. Directriz europea 2020 sobre el tratamiento de la sífilis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021 Mar;35(3):574-588. doi: 10.1111/jdv.16946. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094521.

V. Morshed MG, Singh AE. Tendencias recientes en el diagnóstico serológico de la sífilis. Clin Vaccine Immunol. 2015 Feb;22(2):137-47. doi: 10.1128/CI.00681-14. Epub 2014 nov 26. PMID: 25428245; PMCID: PMC4308867.

VI. CLSI H18-A3 Procedimientos para la manipulación y el procesamiento de muestras de sangre; Directriz aprobada - Tercera edición. Vol. 24 No. 38

19. NOTIFICACIÓN DE INCIDENTES

Si se ha producido un incidente grave relacionado con este aparato en el territorio comercial de la Unión Europea, notifíquelo sin demora al fabricante y a la autoridad competente de su Estado miembro.

20. RESUMEN DE SEGURIDAD Y RENDIMIENTO

Este documento, que estará disponible en la base de datos EUDAMED (cuando esté plenamente implantado y en funcionamiento), forma parte de la Documentación Técnica y puede solicitarse al fabricante.

	EN IT DE ES CS	Date of manufacture Data di fabbricazione Datum der Herstellung Fecha de fabricación Datum výroby	FR GR PT PL RO	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico Data produkcji Data fabricatiei
	EN IT DE ES CS	Use By Utilizzare entro Verwendung innerhalb Utilizar antes de Použijte do	FR GR PT PL RO	Utilisation d'ici Ημερομηνία λήξης Prazo de validade Zużyć do dnia A se folosi pana la
	EN IT DE ES CS	Do not reuse Non riutilizzare Nicht wiederverwenden No reutilizar Nepoužívejte opakovaně	FR GR PT PL RO	Ne pas réutiliser Μην κάνετε επαναληπτική χρήση Não reutilizar Nie używać ponownie A nu se refolosi
	EN IT DE ES CS	Caution, consult accompanying documents Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso Achtung, siehe Gebrauchsanweisung Atención, véanse las instrucciones de uso Pozor, nahlédněte do průvodních dokumentů	FR GR PT PL RO	Attention, voir le mode d'emploi Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída Uwaga, patrz instrukcja obsługi Atentie, consultați documentele însoțitoare
	EN IT DE ES CS	Manufacturer Fabbricante Hersteller Fabricante Výrobce	FR GR PT PL RO	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante Producent Productator
	EN IT DE ES CS	Contains sufficient for <n> tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Ausreichender Inhalt für „n“ Tests Contenido suficiente para "n" ensayos Obsahuje dostatečné množství pro „n“ testů	FR GR PT PL RO	Contenu suffisant pour « n » essais Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios Wystarczająca ilość materiału do „(liczby)” badań Continut suficient pt <n> teste
	EN IT DE ES CS	Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturgrenzwerte Límites de temperatura Teplotní omezení	FR GR PT PL RO	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura Granice temperatury Limita da temperatura
	EN IT DE ES CS	Consult Instructions for Use Consultare le istruzioni per l'uso Siehe Gebrauchsanweisung Consulte las instrucciones de uso Přečtěte si návod k použití	FR GR PT PL RO	Voir le mode d'emploi Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização Należy zapoznać się z instrukcją obsługi Pentru utilizare consultați instrucțiunile
	EN IT DE ES CS	Catalogue number Numero di catalogo Katalognummer Número de catálogo Katalogové číslo	FR GR PT PL RO	Número de catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo Numer katalogowy Numar de catalog
	EN IT DE ES CS	In Vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Medizinisches In-vitro-Diagnosegerät Productos sanitarios para diagnóstico in vitro Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro	FR GR PT PL RO	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro Dizpozitiv medical pentru diagnosticare in vitro
	EN IT DE ES CS	Batch code Codice del lotto Los-Code Código del lote Kód šarže	FR GR PT PL RO	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote Kod partii Lot
	EN IT DE ES CS	CE marking of conformity Marcatura CE di conformità CE-Kennzeichnung Marcado de conformidad CE Označení shody CE	FR GR PT PL RO	Marquage de conformité CE Σημανση συμμορφωσης CE Marcação CE de conformidade Oznakowanie zgodności CE Marcajul de conformitate CE