

UTILISATION PRÉVUE

Le système de test ELISA IgG de *tréponème pallidum* ZEUS a été conçu pour la détection qualitative d'anticorps de classe IgG spécifiques contre le *T. pallidum* dans un échantillon de sérum sanguin humain. Ce test peut être utilisé conjointement avec des tests non tréponéaux et des observations cliniques pour obtenir des preuves sérologiques d'infection à *T. pallidum*. Ce test a été conçu uniquement pour des diagnostics *in vitro*. Ce test n'a pas été conçu pour la sélection de donneurs de sang ou de plasma.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

Le *tréponème pallidum* (sous-espèce de pallidum) est une bactérie mince pesant moins d'un gramme appartenant à l'ordre des spirochaetales (1). C'est l'un des spirochètes cliniquement important qui se trouve relié à des agents comme *Borrelia burgdorferi* et *Leptospira*. Le *tréponème pallidum* est l'agent étiologique de la syphilis (1). Il n'existe pas de système de culture cliniquement disponible pour le *tréponème pallidum* et l'identification microbiologique de l'organisme dépend de techniques telles que la microscopie sur fond noir, la coloration directe par des anticorps fluorescents, la coloration à l'argent et les tests sérologiques (2).

La syphilis n'affecte que les humains. La vaste majorité des infections se font par contact sexuel avec une personne infectée. Les autres modes d'acquisition sont la transmission congénitale à un nouveau-né et la transfusion sanguine, mais ces modes sont beaucoup moins répandus (1, 2). La syphilis se présente généralement sous l'un des stades suivants : primaire, secondaire, latent et tertiaire. Les méthodes de diagnostic précoce de la syphilis sont l'examen des lésions actives sur fond noir et la coloration directe par des anticorps fluorescents. Les principaux tests sérologiques de détection de la syphilis sont les tests non tréponéaux (VDRL) et les FTA ou EIA tréponéaux (1, 3). Les tests tréponéaux et non tréponéaux sont généralement nécessaires pour diagnostiquer présomptivement les cas de syphilis primaire. En règle générale, les tests tréponéaux demeurent positifs à vie après l'infection initiale, peu importe qu'une thérapie appropriée aient ou non été administrée (1, 3). Le système de test IgG *Tréponème pallidum* ZEUS ELISA a été conçu pour la détection d'anticorps de classe IgG contre le *T. pallidum* dans un échantillon de sérum sanguin humain.

PRINCIPE DE L'ANALYSE

Le système de test IgG *Tréponème pallidum* ZEUS ELISA a été conçu pour la détection d'anticorps de classe IgG contre les antigènes p17 de *T. pallidum* dans un échantillon de sérum sanguin humain. Les puits de plusieurs bandes de micropuits en plastique sont sensibilisés par absorption passive avec l'antigène *T. pallidum*. La procédure de test comprend trois étapes d'incubation :

1. Les échantillons de sérum sanguin du test (correctement dilués) sont incubés dans des micropuits enduits d'antigène. Tout anticorps spécifique de l'antigène se trouvant dans le sang s'accrochera à l'antigène immobilisé. La plaque est lavée de façon à enlever les anticorps non fixés et les autres composants sériques.
2. Des IgG antihumaines de chèvre conjuguées à de la peroxydase sont ajoutés dans les puits et la plaque est incubée. Le conjugué réagira avec les anticorps IgG immobilisés sur la phase solide de l'étape 1. Les puits sont lavés pour enlever le conjugué n'ayant pas réagi.
3. Les micropuits contenant du conjugué de peroxydase immobilisé sont incubés avec une solution de substrat peroxydase. L'hydrolyse du substrat avec de la peroxydase produit un changement de couleur. Après un certain temps, la réaction est arrêtée et l'intensité de la couleur de la solution est mesurée par photométrie. L'intensité de la couleur de la solution dépend de la concentration d'anticorps dans l'échantillon d'origine.

COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

Matériel inclus :

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement.

REMARQUE : Les composants suivants contiennent de l'azote de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : contrôles, étalon et SAVE Diluent®.

PLAQUE	1.	Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits, enduits d'antigène de <i>tréponème pallidum</i> p17 recombinant. Les bandes sont emballées dans un porte-bandes et placées avec du desséchant dans une enveloppe hermétiquement fermée.	
CONJ	2.	Conjugué : Solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguée à de la peroxydase du raifort (spécifique à la chaîne Fc). Un flacon de 15 ml avec bouchon blanc. Prêt à l'emploi.	
CONTRÔLE +	3.	Contrôle positif (sérum humain) : Une ampoule de 0,35 ml avec bouchon rouge.	
CAL	4.	Étalon (sérum humain) : Une ampoule de 0,5 ml avec bouchon bleu.	
CONTRÔLE -	5.	Contrôle négatif (sérum humain) : Une ampoule de 0,35 ml avec bouchon vert.	
DIL	SPE	6.	SAVE Diluent® : Un flacon de 30 ml à bouchon vert contenant du Tween-20, de l'albumine de sérum bovin et tampon phosphate salin (pH 7,2 ± 0,2). Prêt à l'emploi. REMARQUE : La solution SAVE Diluent® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.
SOLN	TMB	7.	TMB : Un flacon de 15 ml à bouchon ambre contenant du tétraméthyl-3, 3', 5, 5'-benzidine (TMB). Prêt à l'emploi.
SOLN	ARRÊT	8.	Solution d'arrêt : Un flacon de 15 ml à bouchon rouge contenant du 1M H ₂ SO ₄ , 0.7M HCl. Prêt à l'emploi.
TAMP LAV	10X	9.	Tampon de lavage concentré (10 x) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou déionisée. Un flacon de 100 ml à bouchon transparent contenant une solution de Tween 20 et un tampon phosphate salin concentré 10 x (solution bleue). REMARQUE : La solution 1 x présente un pH de 7,2 ± 0,2.

REMARQUES :

1. Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ELISA : TMB, solution d'arrêt et tampon de lavage. SAVE Diluent® may be used interchangeably with any ELISA Test System utilizing Product No. 005CC.
2. Le système de test contient également une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.

PRÉCAUTIONS

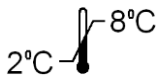
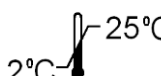
1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. Les puits de la plaque ELISA ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, les bandes doivent être considérées comme des **matériaux biologiques dangereux** et être manipulées en conséquence.

- Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (5).
- Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. **Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20–25°C) avant de commencer le test.** Les réactifs non utilisés doivent être retournés à une température de réfrigération immédiatement après utilisation.
- Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution de lavage résiduelle (p. ex. par absorption ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué ou le substrat. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
- La solution SAve Diluent®, les solutions de contrôle et la solution étalon contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azoture de sodium.
- L'inhalation, l'ingestion et le simple contact cutané de la solution d'arrêt peuvent avoir des effets TOXIQUES, notamment des brûlures. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.
- La solution TMB est nocive. Elle peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
- Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Il peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
- Essuyer le fond de la plaque de façon à enlever les empreintes digitales et les résidus de liquide pouvant fausser les mesures de densité optique.
- La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
- Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
- La solution TMB doit être incolore, jaune très pâle, vert très pâle ou bleu très pâle lors de son utilisation. Une contamination de la solution TMB avec du conjugué ou d'autres oxydants peut causer un changement de couleur prématuré. Ne pas utiliser la solution TMB si elle est nettement bleue.
- Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
- Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
- Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
- Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
- Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
- Laisser les bandes de micropuits et le support arriver à température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice, afin de protéger les puits de toute condensation.
- Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
- Attention : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
- Ne jamais utiliser une plaque ELISA dont la bande indicatrice du sachet de déshydratant est passée du bleu au rose.
- Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azoture de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azoture de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
- Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de micropuits ELISA pouvant lire des mesures avec des longueurs d'ondes de 450 nm. **REMARQUE: il est possible d'utiliser un lecteur à longueur d'onde unique (450 nm) ou à longueur d'onde double (450/620 - 650 nm). L'utilisation d'un lecteur à longueur d'onde double est préférable, puisqu'il a été établi que le filtre de référence supplémentaire réduisait l'interférence potentielle provenant d'anomalies susceptibles d'absorber la lumière.**
- Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 – 200 µl.
- Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 50 – 200 µl.
- Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
- Flacon de lavage ou système de lavage de micropuits.
- Eau distillée ou déionisée.
- Cylindre gradué d'un litre.
- Pipettes sérologiques.
- Embouts de pipettes jetables.
- Serviettes en papier.
- Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
- Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Bandes de micropuits avec revêtement : Refermer immédiatement de façon hermétique le sachet de bandes non utilisées en y laissant le déshydratant et replacer le sachet dans un environnement de stockage approprié. Après l'ouverture du sachet, les bandes demeurent stables pendant 60 jours, tant que les bandes indicatrices du sachet de déshydratant demeurent bleues. Conjugué – NE PAS CONGELER. Système de test non ouvert, étalon, contrôle positif, contrôle négatif, solution TMB, solution SAve Dilent®
	Solution d'arrêt : 2 – 25 °C Tampon de lavage (1 x) : 20 – 25 °C pendant un maximum de 7 jours; 2 – 8 °C pendant un maximum de 30 jours. Tampon de lavage (10 x) : 2 – 25 °C

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* » (dernière édition).
- Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
- Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (7, 8). Ne pas utiliser si un anticoagulant ou un agent de conservation a été ajouté. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.

4. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 – 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (9).

PROCÉDURE D'ANALYSE

- Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 – 25 °C).
- Déterminer le nombre de micropuits nécessaires. Prévoir six déterminations de contrôle/étalon (un blanc réactif, un contrôle négatif, trois étalons et un contrôle positif) par série. Exécuter un blanc réactif pour chaque analyse. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées contrôles/étalon. Replacer les bandes inutilisées dans le sachet en y laissant le déshydratant, puis fermer hermétiquement le sachet et conserver à 2 – 8 °C.

EXEMPLE DE CONFIGURATION DE PLAQUE		
	1	2
A	Blanc	Patient 3
B	Contrôle négatif	Patient 4
C	Étalon	Etc.
D	Étalon	
E	Étalon	
F	Contrôle positif	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

- Préparer une dilution 1:21 (p. ex. 10 µl de sérum + 200 µl de SAVe Diluent®) de contrôle négatif, de étalon, de contrôle positif et de sérum de chaque patient.
REMARQUE : La solution SAVe Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.
- Dans les puits individuels, ajouter 100 µl de contrôle, de étalon et d'échantillon de patient (solutions diluées). S'assurer que les échantillons sont correctement mélangés. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.
- Ajouter 100 µl de solution SAVe Diluent® dans le puits A1 comme blanc réactif. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées de puits de blanc réactif.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
- Laver les bandes de micropuits 5 fois.
 - Procédure de lavage manuel :**
 - Secouer vigoureusement pour faire sortir le liquide des puits.
 - Remplir chaque micropuits de tampon de lavage. S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans les puits.
 - Répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à un total de 5 lavages.
 - Secouer vigoureusement pour faire sortir la solution de lavage de tous les puits. Inverser la plaque sur une serviette en papier et donner des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits. Inspecter visuellement la plaque pour s'assurer qu'il ne reste aucun résidu de solution de lavage. Récupérer la solution de lavage dans un bassin jetable et traiter avec un désinfectant à la fin des procédures de la journée.
 - Procédure de lavage automatisé :**
Si un système automatisé de lavage de micropuits est utilisé, régler le volume distribué à 300 – 350 µl par puits. Programmer un cycle de 5 lavages sans délai entre les lavages. Si nécessaire, la plaque de micropuits peut être retirée de l'appareil de lavage, puis inversée sur une serviette en papier et recevoir des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits.
- Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits, y compris dans les puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
- Laver les micropuits conformément à la procédure décrite dans l'étape 7.
- Ajouter 100 µl de TMB dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 10 ± 15 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits, y compris dans le puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons. Les échantillons positifs passeront du bleu au jaune. Après avoir ajouté la solution d'arrêt, taper plusieurs fois sur la plaque pour que les échantillons soient bien mélangés.
- Programmer le lecteur de micropuits pour lire avec une longueur d'onde de 450 nm et mesurer la densité optique de chaque puits par rapport au blanc réactif. Lire les résultats de la plaque moins de 30 minutes après avoir ajouté la solution d'arrêt.

RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE D'ANALYSE

- Diluer le sérum 1:21.
- Ajouter l'échantillon dilué dans les micropuits à raison de 100 µl/puits.
- Incuber 25 ± 5 minutes.
- Laver.
- Ajouter le conjugué – 100 µl/puits.
- Incuber 25 ± 5 minutes.
- Laver.
- Ajouter le TMB – 100 µl/puits.
- Incuber 10 - 15 minutes.
- Ajouter la solution d'arrêt, 50 µl/puits – Mélanger.
- LIRE les résultats dans les 30 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Chaque fois qu'une analyse est exécutée, le étalon doit être exécuté en trois exemplaires. Un blanc réactif, un contrôle négatif et un contrôle positif doivent également être inclus dans chaque analyse.
- Calculer la moyenne des trois puits de étalon. Si une des trois valeurs est à plus de 15 % de la moyenne, éliminer cette valeur et recalculer la moyenne avec les deux puits restants.
- Les valeurs de densité optique (DO) moyenne du étalon, du contrôle positif et du contrôle négatif devraient se situer dans les plages suivantes :

	Plage DO
Contrôle négatif	≤0,250
Étalon	≥0,300
Contrôle positif	≥0,500

- La DO du contrôle négatif divisée par la DO moyenne du étalon devrait être ≤0,9.

- b. La DO du contrôle positif divisée par la DO moyenne du étalon devrait être $\geq 1,25$.
 - c. Si les conditions ci-dessus ne sont pas satisfaites, le test est invalide et doit être répété.
4. Le contrôle positif et le contrôle négatif servent à détecter une anomalie de réactif substantielle, mais ne garantissent pas la précision à la fin de l'analyse.
 5. Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes.
 6. Le document C24 du CLSI intitulé « *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures* » contient des informations supplémentaires sur les procédures appropriées de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Calculs :

- a. **Facteur de correction** : Le fabricant a déterminé une valeur seuil de densité optique pour les échantillons positifs et l'a corrélée au étalon. Le facteur de correction (FC) permet de déterminer la valeur seuil des échantillons positifs. Il permet également de compenser les légères variations de résultats d'un jour à l'autre. Le facteur de correction est déterminé pour chaque lot de composants et est imprimé sur l'étiquette de composants située du la boîte du système de test.
- b. **Valeur seuil de densité optique** : Pour obtenir la valeur seuil de densité optique, multiplier le FC par la DO moyenne du étalon, déterminée ci-dessus.
($FC \times DO \text{ moyenne du étalon} = \text{Valeur seuil de DO}$)
- c. **Rapports valeur d'indice/DO** : Calculer le rapport valeur d'indice/DO de chaque échantillon en divisant sa valeur de DO par la valeur seuil de DO de l'étape b.

Exemple :	DO moyenne du étalon	= 0,793
	Facteur de correction (FC)	= 0,25
	Valeur seuil de DO	= $0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO inconnue de l'échantillon	= 0,432
	Rapports valeur d'indice/DO de l'échantillon	= $0,432 / 0,198 = 2,18$

2. Interprétations : Les rapports valeur d'indice/DO sont interprétés de la manière suivante.

	Rapport valeur d'indice/DO
Échantillons négatifs	$\leq 0,90$
Échantillons ambivalents	0,91 à 1,09
Échantillons positifs	$\geq 1,10$

- a. Un rapport de DO inférieur ou égal à 0,90 signifie une absence d'anticorps détectables du *T. pallidum* et constitue un résultat non réactif aux anticorps IgG du *T. pallidum*.
- b. Refaire deux fois le test sur les échantillons lorsque les rapports de DO sont dans la zone d'ambivalence (0,91 – 1,09). Le résultat final sera obtenu dès que deux mesures concordantes seront observées. Évaluer répétitivement les échantillons ambivalents avec une autre méthode sérologique et/ou reprendre l'évaluation en prélevant d'autres échantillons une à trois semaines plus tard.
- c. Un rapport de DO égal ou supérieur à 1,10 constitue un résultat positif de détection d'anticorps IgG du *T. pallidum*, l'agent à l'origine de la syphilis. Un résultat positif indique que le patient est ou a déjà été infecté par la bactérie *T. pallidum*. Le technicien de laboratoire doit indiquer que le test a été réactif à l'anticorps IgG du *T. pallidum*. Effectuer une autre analyse sérologique de détection du *T. pallidum* pour confirmer ou annuler le diagnostic de syphilis active.

Tableau 1 : Interprétation du résultat de *T. pallidum*

Résultat non tréponémal	Résultat tréponémal	Interprétation de tous les cas sauf les nouveaux-nés, les bébés et les personnes séropositives (VIH)*
Non réactif	Négatif/non réactif	Aucune évidence sérologique d'infection à <i>T. pallidum</i> (une infection au stade d'incubation ou de début de stade primaire ne peut cependant être exclue).
Réactif	Négatif/non réactif	Une infection actuelle est peu probable; possibilité de fausse positivité due à une autre anomalie biologique (maladie fébrile, vaccinations, médicament intraveineux, maladie auto-immune, etc.). Il est recommandé de répéter le test (non tréponémal et tréponémal avec d'autres méthodes de test).
Non réactif	Positif/réactif	Probabilité d'infection passée ou possibilité de réactivité hétérospécifique avec d'autres spirochètes/antigènes reliés. Il est recommandé d'effectuer d'autres tests selon les observations cliniques/antécédents.** Possibilité de résultat non tréponémal faux négatif à cause d'un prozone, d'une syphilis latente tardive ou d'une neurosyphilis.
Réactif	Positif/réactif	Présomption d'infection actuelle non traitée (ou d'infection incorrectement traitée, d'infection persistante, de réinfection ou de fausse positivité due à des antécédents). Il est recommandé de faire d'autres tests conformément à l'évaluation clinique.*
Non réactif	Test non réalisé	Infection actuelle improbable. Possibilité d'infection antérieure correctement traitée. Faible possibilité de syphilis au stade d'incubation, de début de stade primaire, de syphilis latente ou de neurosyphilis.
Test non réalisé	Négatif/non réactif	Infection présente ou passée improbable. Faible possibilité de syphilis au stade d'incubation, de début de stade primaire.

*Les patients infectés au VIH peuvent présenter un sérouréactivité retardée ou une sérologie négative.

**Test quantitatifs non tréponémaux; antécédents cliniques; test sérologique répété (séquentiel) pour changement de titre.

LIMITES DE L'ANALYSE

1. Interpréter les résultats de test conjointement avec l'évaluation clinique et avec les résultats d'autres procédures de diagnostic.
2. Les caractéristiques de performance de ce dispositif n'ont pas été établies avec des maladies associées à la syphilis.
3. Des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques peuvent fausser le résultat de cette analyse. Éviter d'utiliser de tels échantillons.
4. Il est possible que les résultats de patients ayant un système immunitaire affaibli soient difficiles à interpréter.
5. Les caractéristiques de performance de ce dispositif n'ont pas été établies pour des matrices autres que du sérum sanguin.
6. Les caractéristiques de performance de ce dispositif n'ont pas été établies pour des échantillons contenant des anticorps hétérophiles connus pour causer de fausses positivités dans divers immunoessais.
7. Un résultat positif ne suffit pas pour diagnostiquer une syphilis. Un tel résultat peut aussi être attribué à une infection antérieure. Un résultat négatif peut exclure une infection à la syphilis, sauf en cas de syphilis au stade d'incubation ou au début du stade primaire.

RÉSULTATS ESPÉRÉS

1. Distribution démographique et des groupes d'âge des populations visées :

998 échantillons non sélectionnés ont été testés, dont 500 provenant de personnes pour lesquelles un test de syphilis a été demandé et 498 provenant de femmes enceintes pour lesquelles un test de syphilis a été demandé (deux échantillons ont été exclus des calculs à cause de l'âge des patients). Sur le site 1, un fabricant situé dans la région nord-est des États-Unis, un total de 200 échantillons ont été testés, dont 100 provenant de femmes enceintes et 100 provenant de patients pour lesquels un test de syphilis a été demandé. Sur le site 2, un laboratoire hospitalier situé dans la région nord-est des États-Unis, un total de 400 échantillons ont été testés, dont 200 provenant de femmes enceintes et 200 provenant de patients pour lesquels un test de syphilis a été demandé. Sur le site 3,

un laboratoire hospitalier situé dans la région Atlantique centre (États-Unis), un total de 400 échantillons ont été testés, dont 200 provenant de femmes enceintes et 200 provenant de patients pour lesquels un test de syphilis a été demandé. Les caractéristiques démographiques des patients sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques démographiques des populations testées

Populations	Échantillons testés	Moyenne	Médiane	Minimum	Maximum
Patients avec test de syphilis demandé	500	34,2	31	5	88
Femmes enceintes	500	28,8	28	15	48

2. **Valeurs attendues/plages de référence :**

Pour déterminer les valeurs attendues au sein des populations testées, des chercheurs internes et externes ont évalué les performances du dispositif avec 500 échantillons masqués, prospectivement prélevés chez des patients divers, et 498 échantillons provenant de femmes enceintes. Des instructions ont été données pour que les échantillons soient des prélèvements aléatoires de sérum sanguin non sélectionnés, destinés à des tests de détection d'anticorps de la syphilis. Des études supplémentaires ont été effectuées chez une population de 1000 patients hospitalisés non sélectionnés (un échantillon n'avait pas une quantité suffisante pour le test). Parmi les 500 échantillons prélevés chez des patients de 1 à 70 ans pour lesquels un test de syphilis a été demandé prospectivement, 7 ont produit un résultat positif. Quatre de ces sept échantillons provenaient de patients masculins, ce qui correspond à une prévalence observée de 57,1 %, les trois autres provenant de patientes, ce qui correspond à une prévalence observée de 42,9 %. Le taux de prévalence observé globalement au sein de ce groupe était de 1,4 % (7/500 échantillons). Parmi les 498 échantillons prélevés chez des femmes enceintes ayant de 15 à 48 ans, 3 ont produit un résultat positif. Le taux de prévalence observé au sein de ce groupe était de 0,6 %. Parmi les 999 échantillons prélevés chez des patients hospitalisés non sélectionnés ayant de 1 à 70 ans, 32 ont produit un résultat positif. Quatorze de ces trente-deux échantillons provenaient de patients masculins, ce qui correspond à une prévalence observée de 43,8 %, les dix-huit autres provenant de patientes, ce qui correspond à une prévalence observée de 56,3 %. Le taux de prévalence observé globalement au sein de ce groupe était de 3,2 % (32/999 échantillons).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. **Étude comparative :**

Le système de test ELISA ZEUS IgG *T. pallidum* a été comparé à une procédure commerciale ELISA de détection d'anticorps IgG à *T. pallidum*. Les caractéristiques des sites, des populations et des échantillons testés sont résumées dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Sites	Échantillons prospectifs			Échantillons rétrospectifs			
	Patients avec test de syphilis demandé	Femmes enceintes avec test de syphilis demandé	Patients hospitalisés non sélectionnés	Sérum sanguin acheté provenant de patients infectés au VIH	Sérum sanguin acheté provenant de femmes enceintes	Sérum sanguin acheté, avec tests RPR/TPPA + demandés	Échantillons CDC caractérisés de syphilis
ZEUS	100	100	350	223	0	0	0
Labo hospitalier nord-est	200	200	350	0	277	280	0
Labo hospitalier Atlantique centre	200	200	300	0	0	0	0
CDC	0	0	0	0	0	0	157
Total	500	500	1000	223	277	280	157

a. **Performance au sein de populations avec prélèvement prospectif :** L'étude comparative sur des populations ciblées a été réalisée avec 500 échantillons de sérum sanguin non sélectionnés provenant de patients pour lesquels un test de syphilis a été demandé, et 500 échantillons de sérum sanguin achetés, provenant de femmes enceintes.

Tableau 4 : Sérum sanguin en réserve provenant de patients pour lesquels un test de syphilis a été demandé

		Prévisions					
		Positif	Ambivalent	Négatif	Total du site	PPA/NPA	IC 95 %
Test ELISA ZEUS IgG <i>T. pallidum</i>	Positif	4	0	3	7	80,0	28,4 - 99,5
	Ambivalent	1	0	1	2		
	Négatif	0	0	491	491	99,2	97,9 - 99,8
	Total du site	5	0	495	500		

Tableau 5 : Sérum sanguin en réserve acheté, provenant de femmes enceintes pour lesquelles un test de syphilis a été demandé

		Prévisions					
		Positif	Ambivalent	Négatif	Total du site	PPA/NPA	IC 95 %
Test ELISA ZEUS IgG <i>T. pallidum</i>	Positif	3	0	0	3	75,0	19,4 - 99,4
	Ambivalent	0	0	0	0		
	Négatif	1	0	494	495	100,0	99,4 - 100
	Total du site	4	0	494	498		

*Deux échantillons n'ont pas respecté les critères d'inclusion aux tests.

Les caractéristiques de performance des 1000 patients hospitalisés non sélectionnés apparaissent dans le tableau 6. Ces échantillons provenaient de la charge de travail ordinaire d'un laboratoire d'hôpital.

Tableau 6 : Patients hospitalisés non sélectionnés

		Prévisions					
		Positif	Ambivalent	Négatif	Total du site	PPA/NPA	IC 95 %
Test ELISA ZEUS IgG <i>T. pallidum</i>	Positif	13	1	18	32	61,9	38,4 - 81,9
	Ambivalent	1	0	9	10		
	Négatif	7	0	950	957	97,1	95,9 - 98,1
	Quantité insuffisante	0	0	1	1		
	Total du site	21	1	978	1000		

b. **Performance au sein de populations avec prélèvement rétrospectif :** Des études comparatives avec des échantillons recueillis auprès de populations spéciales ont été réalisées chez ZEUS Scientifique. Les échantillons ont été achetés chez un fournisseur de sérum sanguin.

Tableau 7 : Échantillons achetés, provenant de personnes infectées au VIH-1

		Prévisions					
		Positif	Ambivalent	Négatif	Total du site	PPA/NPA	IC 95 %
Test ELISA ZEUS IgG <i>T. pallidum</i>	Positif	41	0	1	42	85,4	72,2 - 93,9
	Ambivalent	1	0	0	1		
	Négatif	4	2	174	180	99,4	96,9 - 100
	Total du site	46	2	175	223		

Tableau 8 : Sérum sanguin acheté, provenant de femmes enceintes avec résultat connu TPPA positif (27) et non réactif RPR/TPPA (250)

		Prévisions					
		Positif	Ambivalent	Négatif	Total du site	PPA/NPA	IC 95 %
Test ELISA ZEUS IgG T. <i>pallidum</i>	Positif	26	1	0	27	92,9	76,5 - 99,1
	Ambivalent	0	0	0	0		
	Négatif	2	0	248	250	99,6	97,8 - 100
	Total du site	28	1	248	277		

Tableau 9 : Sérum sanguin acheté, avec résultats connus RPR/TPPA réactifs

		Prévisions					
		Positif	Ambivalent	Négatif	Total du site	PPA/NPA	IC 95 %
Test ELISA ZEUS IgG T. <i>pallidum</i>	Positif	259	1	4	264	98,5	96,2 - 99,6
	Ambivalent	1			1		
	Négatif	3		12	15	70,6	46,9 - 98,7
	Total du site	263	1	16	280		

Un lot de 157 échantillons caractérisés en clinique a été obtenu du CDC et testé. Les résultats sont présentés de façon à communiquer des informations supplémentaires sur le système de test et ne signifient pas que l'analyse est reconnue par le CDC. Le résumé des résultats du lot d'échantillons caractérisés apparaît dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Résultats avec échantillons caractérisés en clinique

Diagnosics cliniques	Résultats de test ELISA IgG T. <i>pallidum</i>				% d'accord avec diagnostics cliniques présentés avec IC 95 %	
	Positif	Ambivalent	Négatif	Total		
Stade primaire traité	11	0	0	11	100 (11/11)	76,2 - 100
Stade secondaire non traité	41	0	2	43	95,3 (41/43)	84,2 - 99,4
Stade secondaire traité	39	0	0	39	100 (39/39)	92,6 - 100
Stade latent non traité	6	0	5	11	54,5 (6/11)	23,4 - 83,3
Stade latent traité	48	0	2	50	96,0 (48/50)	86,3 - 99,5
Congénital	1	1	1	3	33,3 (1/3)	0,84 - 90,6
Total	146	1	10	157	93,0 (146/157)	87,8 - 96,5

2. Reproductibilité :

La reproductibilité a été évaluée en interne et sur deux sites cliniques externes. L'étude a été réalisée de la manière suivante : Quinze échantillons ont été identifiés et/ou préparés par ZEUS Scientific en vue de les utiliser dans le cadre de l'étude, en fonction de leur activité durant l'analyse. Le lot d'échantillons comprenait trois échantillons négatifs, fortement négatifs, près de la valeur seuil, faiblement positifs et fortement positifs. Pour évaluer la reproductibilité, lors de chaque jour de test, chaque échantillon a été dilué dans deux récipients et chaque dilution a divisée en trois pour autant d'analyses. Cette procédure a été répétée par un deuxième technicien, ce qui a produit un total de douze résultats par jour. Ce processus a été répété pendant cinq jours sur chaque site et les données ainsi obtenues ont été employées pour évaluer la reproductibilité.

Tableau 11 : Sommaire de l'étude de reproductibilité sur plusieurs sites - Test ELISA IgG T. *pallidum*

Membre de lot	Échantillon (N)	Valeur d'indice moyenne	Dans le cycle		Dans le jour		Entre cycles		Entre sites		Total	
			ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV
Négatif 1	180	0,06	0,01	14,7	0,01	19,3	0,01	10,7	0,02	29,1	0,02	36,6
Négatif 2	180	0,08	0,01	9,7	0,01	12,2	0,01	8,3	0,01	14,6	0,01	15,5
Négatif 3	180	0,31	0,03	8,6	0,03	10,7	0,02	6,6	0,04	12,7	0,04	13,3
Fortement négatif 1	180	0,80	0,04	5,1	0,05	6,3	0,03	4,2	0,06	7,3	0,06	7,3
Fortement négatif 2	180	0,74	0,04	5,1	0,04	5,8	0,02	3,0	0,05	7,0	0,05	7,4
Fortement négatif 3	180	0,76	0,04	5,0	0,04	5,6	0,21	2,7	0,05	6,5	0,05	7,2
Limite 1	180	1,05	0,07	6,3	0,07	7,3	0,03	3,6	0,09	9,0	0,11	10,3
Limite 2	180	1,13	0,05	4,7	0,06	5,4	0,04	3,1	0,07	6,0	0,08	6,7
Limite 3	180	0,95	0,05	5,6	0,07	6,7	0,04	4,0	0,08	8,5	0,09	9,9
Faiblement positif 1	180	1,45	0,09	6,2	0,11	7,6	0,06	4,4	0,13	8,9	0,14	9,6
Faiblement positif 2	180	1,77	0,11	5,9	0,14	7,8	0,10	5,8	0,15	8,3	0,16	9,2
Faiblement positif 3	180	1,93	0,14	7,1	0,17	8,9	0,12	5,9	0,19	9,7	0,21	10,7
Positif	180	3,6	0,20	5,7	0,22	6,2	0,10	2,8	0,30	8,4	0,37	10,2
Positif 2	180	3,1	0,20	6,2	0,22	7,3	0,13	4,4	0,28	9,0	0,34	10,9
Positif 3	180	3,1	0,18	5,7	0,22	6,9	0,16	4,9	0,26	8,4	0,31	10,2
Contrôle non réactif	180	0,09	0,01	10,6	0,01	12,8	0,01	6,2	0,01	15,9	0,02	21,0
Contrôle réactif	180	3,9	0,16	4,1	0,12	5,1	0,14	3,5	0,22	5,7	0,02	5,9

La précision a été évaluée en interne sur le site du fabricant. L'étude a été réalisée de la manière suivante : Quinze échantillons ont été identifiés et/ou préparés par ZEUS Scientific en vue de les utiliser dans le cadre de l'étude, en fonction de leur activité durant l'analyse. Le lot d'échantillons comprenait trois échantillons négatifs, fortement négatifs, près de la valeur seuil, faiblement positifs et fortement positifs. Pour évaluer la précision, lors de chaque jour de test, chaque échantillon a été dilué dans deux récipients pour autant d'analyses. Cette procédure a été répétée par un deuxième technicien, avec un autre lot, ce qui a produit un total de quatre résultats par jour. Ce processus a été répété pendant douze jours et les données ainsi obtenues ont été employées pour évaluer la précision.

Tableau 12 : Sommaire de l'étude interne de reproductibilité - Test ELISA IgG *T. pallidum*

Membre de lot	Échantillon (N)	AU/ml moyen	Dans le cycle		Dans le jour		Entre cycles		Total	
			ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV	ET	% CV
Négatif 1	48	0,08	0,003	3,8	0,006	8,0	0,006	6,8	0,011	13,1
Négatif 2	48	0,12	0,005	4,0	0,003	6,5	0,009	7,0	0,013	10,5
Négatif 3	48	0,50	0,017	3,6	0,034	9,5	0,020	3,9	0,045	9,0
Fortement négatif 1	48	0,75	0,057	7,6	0,030	8,6	0,019	2,5	0,058	7,7
Fortement négatif 2	48	0,72	0,046	6,4	0,014	7,1	0,015	2,0	0,052	7,2
Fortement négatif 3	48	0,74	0,015	2,0	0,018	4,7	0,011	1,4	0,034	4,5
Limite 1	48	0,92	0,028	3,0	0,025	5,0	0,036	3,9	0,056	6,1
Limite 2	48	1,04	0,022	2,1	0,014	3,9	0,033	3,1	0,045	4,3
Limite 3	48	0,95	0,037	3,9	0,025	6,4	0,036	3,8	0,061	6,4
Faiblement positif 1	48	1,48	0,029	2,0	0,029	3,9	0,014	0,9	0,058	3,9
Faiblement positif 2	48	1,43	0,026	1,8	0,020	2,5	0,017	1,2	0,050	3,5
Faiblement positif 3	48	1,65	0,027	1,6	0,037	4,2	0,018	1,1	0,078	4,7
Fortement positif 1	48	5,43	0,131	2,4	0,154	3,8	0,27	5,0	0,38	7,0
Fortement positif 2	48	4,85	0,110	2,3	0,176	3,6	0,17	3,6	0,29	6,0
Fortement positif 3	48	4,74	0,136	2,8	0,189	4,9	0,17	3,5	4,74	5,2
Contrôle non réactif	48	0,13	0,004	3,3	0,008	6,23	0,007	5,39	0,010	8,2
Contrôle réactif 1	48	5,63	0,049	7,5	5,5	5,15	0,29	5,11	0,42	7,51

3. Réactivité croisée:

Des études ont été réalisées sur le site de fabrication pour évaluer la réactivité croisée avec le système de test IgG *T. pallidum* à l'aide d'échantillons séropositifs à VEB, ANA, RF IgM, rubéole, VIH, VHS 1, VHS 2, grossesse, hépatite B, VZV IgG, VZV IgM, CMV, toxoplasme, Lyme G/M et hépatite C. Des systèmes de tests à immunoessais fabriqués pour une distribution commerciale ont été utilisés pour déterminer la séropositivité des échantillons. Les résultats des tests de grossesse et d'hépatite B/C ont été réalisés par d'autres sites d'analyse. Dix échantillons pour chaque possibilité de réaction croisée ont été testés. Les résultats présentés ont été obtenus en testant des analytes avec des concentrations élevées de substances ayant des possibilités de réaction croisée. Les résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Réactivité croisée

Analyte	Échantillons positifs/échantillons testés
EBV	0/10
ANA	0/10
RF IgM	0/10
Rubéole	0/10
VIH	0/10
VHS 1	0/10
VHS 2	0/10
Grossesse	0/10
Hépatite B	0/10
VZV	0/10
VZV IgM	0/10
CMV	0/10
Toxoplasme	0/10
Lyme G/M	0/10
Hépatite C	0/10

4. Substances interférentes :

Les effets de certaines substances susceptibles de fausser les résultats de ces analyses ont été évalués, notamment en ce qui concerne les substances suivantes : albumine, bilirubine, cholestérol, hémoglobine, triglycérides et intralipides. Les quantités d'analyte dans chaque substance interférente sont les suivantes :

Bilirubine : 1 mg/dl (creux), 15 mg/dl (pics)
 Albumine : 3,5 g/dl (creux), 5 g/dl (pics)
 Cholestérol : 150 mg/dl (creux), 250 mg/dl (pics)
 Triglycérides : 150 mg/dl (creux), 500 mg/dl (pics)
 Hémoglobine : 10 g/dl (creux), 20 g/dl (pics)
 Intralipides : 300 mg/dl (creux), 750 mg/dl (pics)

Tous les échantillons positifs ont présenté des variations de signaux inférieures à 20 %. Les échantillons limites ont présenté une variation de signal inférieure à 20 %, sauf pour un pic élevé d'hémoglobine (25,2 %). L'échantillon négatif a présenté une variation de signal (supérieure à 20 %) avec les creux et les pics d'albumine, d'hémoglobine, d'intralipide, de bilirubine, de cholestérol et de triglycérides. Dans tous les cas, les résultats d'échantillons négatifs sont demeurés sous la valeur de seuil et la variation de signal n'a pas affecté le résultat qualitatif.

RÉFÉRENCES

1. Stevens RW and Schmitt ME: Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Treponemal Antibody. Journal of Clinical Microbiology. 21(3):399-402, 1985.
2. World Health Organization Technical Report Series: Treponemal Infections. No.674, 1982.
3. Farnes SW, and Setness P: Serologic Tests for Syphilis. Post Graduate Medicine. 87(3): 37-46, 1990.

4. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 4th Ed., 1999.
5. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration; Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed.Register 56:64175-64182, 1991.
6. Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline. NCCLS/CLSI Document M29, Vol.17(12), 1997.
7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition; Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12. Approved Guideline 1990.
9. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA

Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2

International: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Website: www.zeusscientific.com

ZEUS ELISA et SAve Diluent® sont des marques de commerce de ZEUS Scientific

Si vous désirez une assistance clientèle aux États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.

Si vous avez besoin d'assistance technique aux États-Unis, veuillez contacter ZEUS Scientific au numéro de téléphone gratuit indiqué ou par courriel à support@zeusscientific.com.

Les clients ayant besoin d'assistance commerciale ou technique hors des États-Unis doivent contacter leur distributeur régional.

© 2017 ZEUS Scientific Tous droits réservés.



EMERGO EUROPE
Westervoortsbedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands