

TPHA

**KITS FOR THE QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE DETECTION OF
ANTIBODY TO *TREPONEMA PALLIDUM* IN HUMAN SERUM OR PLASMA
BY PASSIVE HAEMAGGLUTINATION**

TPHA - 200 tests

TPHA - 500 tests

INSTRUCTION FOR USE

BIO-RAD

ТРНА

Σ 200

REF 72503

Σ 500

REF 72504

-
- (BG) • Други езици можете да получите от представителя на Bio-Rad. Задължително използвайте варианта на листовката, описан върху опаковката (i).
- (CZ) • Ostatní požadované jazyky jsou k dispozici u vašeho místního prodejce Bio-Rad. Používejte pouze verzi příbalového letáku uvedenou na obalu (i).
- (DE) • Andere Sprachen sind auf Anfrage von Ihrer Bio-Rad-Vertretung vor Ort erhältlich. Es ist zwingend die auf der Schachtel genannte Version der Packungsbeilage zu verwenden (i).
- (DK) • Hvis der ønskes andre sprog, kan de fås hos den lokale Bio-Rad-repræsentant. Indlægssedlen, som er angivet på kassen, skal altid anvendes (i).
- (EE) • Teistes keeltes juhendi saate soovi korral kohalikult Bio-Rad esindajalt. Kohustuslik on kasutada karbil mainitud pakendi infolehe versiooni (i).
- (EN) • Other requested languages can be obtained from your local Bio-Rad agent. Imperatively use the package insert version mentioned on the box (i).
- (ES) • Puede solicitar otros idiomas a su agente local Bio-Rad. Utilice obligatoriamente el paquete adjunto, versión indicada en la caja (i).
- (FI) • Muita kieliä on saatavilla omalta Bio-Rad -edustajaltanne. Käytä ehdottomasti laatikossa mainittua tuoteselosteversiota (i).
- (FR) • Pour obtenir d'autres langues, contacter votre agent Bio-Rad. Utiliser obligatoirement la version de la notice mentionnée sur la boîte (i).

BIO-RAD

- (GR)** • Τις άλλες απαιτούμενες γλώσσες μπορείτε να τις πάρετε από τον τοπικό πράκτορά σας Bio-Rad. Χρησιμοποιήστε οπωσδήποτε την παραλλαγή ένθετου συσκευασίας που αναγράφεται στο κουτί ().
- (HR)** • Ostali traženi jezici mogu se dobiti od lokalnog Bio-Rad agenta. Potrebno je koristiti onu verziju uputstva za upotrebu koja je navedena na kutiji ().
- (HU)** • Egyéb nyelveken a helyi Bio-Rad képviselőtől szerezhető be. A dobozon szereplő verziószámú tájékoztatót kell kötelező érvénnyel használni ().
- (IT)** • E' possibile avere i Manuali di Istruzioni in altre lingue richiedendoli al collaboratore Bio-Rad di zona. Utilizzare tassativamente il manuale di istruzioni della versione citata sulla confezione ().
- (LT)** • Informaciją gimtąja kalba galima gauti iš vietinio „Bio-Rad“ atstovo. Privaloma naudoti įdėtinę paketo versiją, nurodytą ant dėžutės ().
- (MT)** • Lingwi oħrajn mitlubin jistgħu jinkisbu mingħand l-agent ta' Bio-Rad lokali tiegħek. Huwa mistenni li tuża l-verżjoni tal-ful-jett ta' tagħrif imsemmija fuq il-kaxxa ().
- (NL)** • Andere gevraagde talen kunnen worden verkregen bij uw plaatselijke Bio-Rad agent. Gebruik uitsluitend de op de doos vermelde versie van de bijsluiter ().
- (NO)** • Andre etterspurte språk kan fås fra din lokale Bio-Rad representant. Om nødvendig bruk pakningsvedlegget som følger med ().
- (PL)** • Informację w innych językach można otrzymać u miejscowego przedstawiciela firmy Bio-Rad. Należy bezwzględnie zapoznać się z ulotką dołączoną do produktu wskazaną na opakowaniu ().
- (PT)** • É possível obter outros idiomas solicitados junto da sua agência Bio-Rad local. Consulte obrigatoriamente a versão do folheto informativo referida na embalagem ().
- (RO)** • Alte limbi solicitate pot fi obținute de la agentul dumneavoastră local Bio-Rad. Este imperativ să utilizați versiunea prospectului menționată pe cutie ().
- (SE)** • Andra språk kan fås av din lokala Bio-Rad-återförsäljare. Använd alltid den version av bipacksedeln som anges på förpackningen ().
- (SI)** • Druge želene jezike lahko dobite pri krajevnem zastopniku Bio-Rad. Obvezno uporabite različico navodil za uporabo, navedeno na škatli ().
- (SK)** • Ďalšie jazyky si môžete vyžiadať u svojho miestneho zástupcu Bio-Rad. Bezpodmienečne používajte verziu príbalového letáku uvedenú na škatuli ().

TPHA

 200

 72503

 500

 72504

KITS FOR THE QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE
DETECTION OF ANTIBODY TO *TREPONEMA*
PALLIDUM IN HUMAN SERUM OR PLASMA BY
PASSIVE HAEMAGGLUTINATION

 883683 - 2014/12

BIO-RAD

TABLE OF CONTENT

1. INTENDED USE.....	5
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST.....	5
3. PRINCIPLES OF THE PROCEDURE.....	5
4. REAGENTS	6
5. WARNING AND PRECAUTIONS.....	7
6. SPECIMENS	8
7. PROCEDURE.....	8
8. TEST LIMITATION	12
9. PERFORMANCES CHARACTERISTICS.....	13
10. BIBLIOGRAPHY REFERENCES.....	15

1. INTENDED USE

TPHA kits are intended for use for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies to *Treponema pallidum* in human serum and plasma. The product may be used for the screening of blood donors, and to aid in the diagnosis of patients where syphilis infection is suspected.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Syphilis is a chronic infection that progresses through distinct stages of infection: primary, secondary, tertiary, and quaternary. These stages produce diverse clinical symptoms, typically producing initial sores known as chancres then syphilitic rash followed by long periods of dormancy. Untreated infection may eventually result in cardiovascular problems and neurosyphilis.

The infection is caused by the spirochaete *Treponema pallidum*, and is usually acquired by sexual contact, although the disease may be transmitted by transfusion of infected blood. Intrauterine infection also occurs. The organism has proved virtually impossible to culture in artificial media, and diagnosis of the infection usually depends on the demonstration of antibodies in the blood, which appear soon after initial infection and may persist for many years.

Tests for Syphilis fall into four categories: direct microscopic examination, treponemal antibody tests, non - treponemal antibody tests and direct antigen tests. Because of the long periods of dormancy and the non - specific nature of non - treponemal tests, methods that detect specific anti-treponemal antibodies in blood specimens have become increasingly popular for screening. TPHA is one such test.

3. PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

TPHA kits use preserved avian erythrocytes coated with antigens of *T. pallidum* (Nichols strain), which will bind with specific antibody present in patient's serum or plasma. The cells are suspended in a medium containing components to eliminate non - specific reactions. Positive reactions are shown by agglutination of the cells, negative reactions by the settling of the cells to a button or small ring.

Although these kits are intended for use primarily as qualitative tests, antibody levels may be titrated by doubling dilution.

Agglutination patterns may be interpreted by eye.

4. REAGENTS

4.1. Description

Identification on label		Description	Presentation	
			72503 200 tests	72504 500 tests
R1	Test Cells	Test Cells Suspension of Avian erythrocytes coated with antigens of <i>T. pallidum</i> , containing Bovine Serum Albumin (BSA)	2 vials 7.8 ml	2 vials 20 ml
R2	Control Cells	Control Cells Suspension of Avian erythrocytes, containing BSA	2 vials 7.8 ml	1 vial 20 ml
R3	Diluent	Diluent Saline solution containing Rabbit serum	2 vials 20 ml	1 vial 125 ml
R4	Positive Control	Positive Control Human serum containing antibodies to <i>T. pallidum</i> , negative for HBs Antigen, anti-HIV1/2, and anti-HCV antibodies diluted in phosphate buffer	1 vial 1 ml	1 vial 1 ml
R5	Negative Control	Negative Control Rabbit serum in phosphate buffer	1 vial 1 ml	1 vial 1 ml

4.2. Storage and handling requirements

This kit should be stored at +2-8°C. Store bottles up-right. Do not freeze.

Each item of the kit preserved at +2-8°C can be used up to the expiry date mentioned on the package. After opening and in the absence of contamination, the R1, R2, R3, R4 and R5 reagents preserved at +2-8°C, can be used up to the expiry date shown on the label.

5. WARNING AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use. For healthcare professional use.

5.1. Health and Safety precautions:

- This test kit should be handled only by qualified personnel trained in laboratory procedures and familiar with their potential hazards. Wear appropriate protective clothing, gloves and eye/face protection and handle appropriately with the requisite Good Laboratory Practices.
- The control materials supplied are derived from human serum. They have been tested at donor level and found negative for HBs Antigen, anti-HIV1/2, and anti-HCV antibodies. No known test method can offer complete assurance that infectious agents are absent. Therefore, all human blood derivatives, reagents and human specimens should be handled as if capable of transmitting infectious disease, following recommended Universal Precautions for blood borne pathogens as defined by local, regional and national regulations.
- Biological spills: Human source material spills should be treated as potentially infectious.

Spills not containing acid should be immediately decontaminated, including the spill area, materials and any contaminated surfaces or equipment, with an appropriate chemical disinfectant that is effective for the potential biohazards relative to the samples involved (commonly a 1:10 dilution of household bleach, 70-80% Ethanol or Isopropanol, an iodophor [such as 0.5% Wescodyne™ Plus, etc.], and wiped dry.

Spills containing acid should be appropriately absorbed (wiped up) or neutralized, the area flushed with water and wiped dry; materials used to absorb the spill may require biohazardous waste disposal. Then the area should be decontaminated with one of the chemical disinfectants.

Note: Do not place solutions containing bleach into the autoclave !

- Dispose of all specimens and material used to perform the test as though they contain an infectious agent. Laboratory, chemical or biohazardous wastes must be handled and discarded in accordance with all local, regional and national regulations.
- The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

5.2. Precautions related to the procedure

5.2.1. Preparing

The reliability of the results depends on correct implementation of the following Good Laboratory Practices:

- Do not mix or associate reagents from different lots within a test run.
- Do not use expired reagents.
- Before use wait for 30 minutes for the reagents to stabilize at room temperature (18-30°C).

5.2.2. Processing

- Do not change the assay procedure.
- Use a new distribution tip for each sample.

6. SPECIMENS

Serum or plasma (EDTA, Sodium Citrate, Heparin and ACD) specimens should be free of blood cells and of obvious microbial contamination. They may be stored at +2-8°C for up to 7 days before testing. Specimens needing longer storage should be frozen at -20°C or lower. Frozen specimens should be thawed and well mixed before testing. Do not repeat more than 5 freeze/thaw cycles. Heated samples at 56°C during 3 hours do not impact the results.

Specimens containing up to 100 mg/L of bilirubin, up to 36 g/L of triglycerid and up to 10 g/L of hemoglobin do not affect the results. However, it is not recommended to use hyperlipaemic or hyperhaemolysed sera or plasma.

If the specimens are to be shipped, they must be packaged in accordance with the regulations in force regarding the transport of etiological agents and preferably transport frozen.

7. PROCEDURE

REMARK: The kit Positive and Negative Controls (R4 and R5) must be run with each run of tests.

7.1. Materials required but not provided

- Distilled water
- Sodium hypochlorite (household bleach) and sodium bicarbonate.
- Absorbent paper
- Disposable gloves
- Safety glasses
- Disposable tubes
- Automatic or semi-automatic, adjustable or preset pipettes or multipipettes to measure and dispense 10 µl, 25 µl, 75 µl and 190 µl.

- Microplate shaker
- U well plate format (96-well microplates) - Code 83375 (5 plates)
- Container for biohazardous waste

7.2. Assay Procedure (Manual technique)

7.2.1. Qualitative assay

Three wells from the U microplate are needed for each specimen.

The TPHA 500 Kit (Product No. 72504) is intended for screening large numbers of specimens and contains only a small volume of Control Cells. It is intended that specimens are screened using only Test Cells in the first instance, and the Control Cells should be used when repeating tests on specimens giving a positive result when first tested.

a. Specimen and Controls Dilution (to 1 in 20)

Add 190 µl of the diluent (R3) to one well.

Add 10 µl of specimen or Positive Control (R4) or Negative Control (R5) to the same well.

Mix thoroughly.

b. Test

Transfer 25 µl of diluted control or diluted specimen from dilution step to test well.

Transfer 25 µl of diluted control or diluted specimen dilution step to control well.

Re-suspend the Test Cells (R1) and the Control Cells (R2) by shaking the vial. Examine for complete suspension.

Add 75 µl of Test Cells (R1) to test well and 75 µl of Control Cells (R2) to the control well.

Final specimen dilution is 1: 80.

Mix wells thoroughly.

Incubate at room temperature (15-30 °C) on a vibration-free surface for a minimum of 45 minutes.

Read the settling patterns. Agglutination patterns are stable for at least three hours if undisturbed.

7.2.2. Semi-Quantitative assay

9 wells of the U microplate are needed for each specimen: One well for the specimen or control dilution and 8 wells for the titration.

Note: The Positive and Negative Controls (R4 and R5) must be run with each lot of tests, using the procedure given below.

a. Specimen and Controls Dilution (to 1 in 20)

Add 190 μl of the diluent (R3) to one well.

Add 10 μl of specimen or Negative Control (R5) or Positive Control (R4) to the same well.

Mix thoroughly.

b. Titration

Leaving the first well empty, add 25 μl of diluent (R3) to each of the remaining 7 wells.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 μl (R3) + 10 μl Specimen or (R4) or (R5)		25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3
Specimen or control dilutions	8 wells for titration							

Transfer 25 μl of diluted control or specimen to the 1st well and to the 2nd well, then mix.

Then serially dilute along the well sequence, discarding the excess 25 μl from the final well.

		25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	
0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 μl (R3) + 10 μl Specimen or (R4) or (R5)	25 μl of diluted control	25 μl of R3 + 25 μl of diluted control	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3	25 μl of R3
Specimen or control dilutions	8 wells for titration							

Discarding excess 25 μl

c. Test

Gently mix the Test Cells (R1) to ensure thorough resuspension.

Add 75 μl of Test Cells (R1) to each well.

Final specimen dilution range after addition of cells is 1: 80 – 1 :10240.

Mix thoroughly.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 µl (R3) + 10 µl Specimen or (R4) or (R5)	25 µl of diluted control + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Specimen or control dilutions	8 wells for titration							

Incubate at room temperature (15-30°C) on a vibration-free surface for a minimum of 45 minutes.

Read the settling patterns. Agglutination patterns are stable for at least three hours if undisturbed.

The titre of the specimen is the reciprocal of the highest dilution giving agglutination.

7.3. Quality Control

The kit Controls must give the correct result; Negative Control (R5) is negative and Positive Control (R4) is positive.

When the kit Positive Control (R4) is titrated, the expected end point is 1:640 - 1:5120.

7.4. Interpretation of the results and Test Validation criteria



Positive

Equivocal

Negative

	Test Cells	Control Cells
Positive: Strong	Full cell pattern covering the bottom of the well.	Negative button
Weak Positive	Cell pattern covers approx. 1/3 of the well bottom.	Negative button
Equivocal	Cell pattern shows a distinctly open centre.	Negative button
Negative	Cells settled to a compact button, typically with a small clear centre.	Negative button
Non-specific reaction	Positive reaction.	Positive reaction

A sample where the Test Cell well is non-reactive should be considered as **negative for *T. pallidum***.

Reactivity less than equivocal is considered negative.

Any specimen giving equivocal or positive results should be considered as positive and the test procedure repeated as above, in duplicate, adding the Control Cells (R2) provided to one set of cells and Test cells (R1) to the other.

If at least in one of the well with Test cells (R1), the result is equivocal or positive, the specimen should be considered as **positive for *T. pallidum***.

For non-specific reaction, if the agglutination is greater in the Test Cells (R1) than in the Controls Cells (R2), then the sample is considered positive and should be repeated as above.

When a sample has greater or equal agglutination in the Control Cells (R2) then the sample should be absorbed using the following procedure.

7.5. Absorption of non-specific reactions

(Procedure to be used if agglutination is seen in both Test and Control cells).

1. Add 10 µl of specimen to 190 µl of resuspended Control Cells, mix well and incubate at room temperature for 30 minutes.
2. Centrifuge to deposit the cells at a minimum of 1500g for 3 minutes.
3. Add 25 µl of supernatant from step 2 to each of 2 wells.
4. Gently mix the Test and Control Cells to ensure thorough resuspension.
Add 75 µl of Test Cells to the 1st well.
Add 75 µl of Control Cells to the 2nd well.
5. Ensure thorough mixing and incubate at room temperature for a minimum of 45 minutes.
6. Read and interpret the settling patterns as above.

8. TEST LIMITATION

No single test or definitive reference standard is available for every stage of the disease. Thus, Syphilis diagnosis relies predominantly on serological testing, requiring results from both non-treponemal and treponemal methods.

No diagnostic test provides absolute assurance that a sample does not contain low levels of antibodies to *T. pallidum*, such as those present at a very early stage of infection. Therefore, a negative result at any time does not preclude the possibility of exposure to infection with syphilis.

All treponemal test results tend to remain reactive following treponemal infection therefore they should not be used to evaluate response to therapy. Because of the persistence of reactivity, generally for the life of the patient, the treponemal tests are of no value in determining relapse or re-infection in a patient who had a reactive result. In this case, it is recommended to use other assays: Syphilis Total Ab, Syphilis IgM EIA and RPR.

9. PERFORMANCES CHARACTERISTICS

9.1. Precision Study

Precision study was realized by testing 3 samples (1 negative, 1 low positive and 1 positive) in 10 replicates in the same run (repeatability) and in 2 replicates during 5 days on 2 different lots and reading by 2 operators (Intermediate precision).

Repeatability: The 3 samples gave identical results when repeated 10 times.

Intermediate/ inter-lot precision: The 3 samples gave identical results when tested in the different conditions (40 times).

9.2. Clinical performance

The performances of the TPHA assay have been determined by testing samples from random blood donors, hospitalized patients, patients infected with syphilis and on samples positive for markers unrelated to infection by the *T. pallidum*.

The studies were carried out on 2 blood donor sites and at the Bio-Rad site.

9.2.1. Specificity

A total of 5032 samples from blood donors prospectively collected in 2 different sites were studied.

The samples were either serum (3626), EDTA K2 (539) or Lithium Heparin plasma (867) tested in a period of less than 7 days after sampling and were compared to the screening assay used in the laboratory.

Table 1 : Blood donor population

Site	Number	Initial Reactive samples (IR)	Repeated Reactive samples (RR)	Specificity (%)	95% Confidence Interval
Site # 1	2519	18	7	99.72% (2512/ 2519)	99.43% – 99.89%
Site # 2	2513*	20	7	99.72% (2505 / 2512)	99.43% – 99.89%
Total	5032	38 (8 positive, 30 equivocal)	14 (3 positive, 11 equivocal)	99.72% (5017/5031)	99.53% – 99.85%

*: one sample (true positive) was withdrawn from the calculation.

The total specificity on the blood bank population is equal to **99.72% (5017/5031)** with a 95% confidence interval of [99.53% – 99.85%]. Among the 14 false positive samples, 11 were found repeated equivocal.

A retrospective study was also carried out on 201 frozen samples from patients from a Sexually Transmitted Disease Center or from vendors, which were found negative for syphilis.

Specificity on these samples is found at **99.5% (200/201)** with a 95% confidence interval at [97.3%- 100.0%].

9.2.2. Sensitivity

The sensitivity study was studied on 435 retrospective frozen serum samples from the laboratory of Sexually Transmitted Disease Center, or from frozen samples from vendors. These samples were characterized positive by immunoassays, FTA assay, RPR/ VDRL assay or TPHA assays according to their origin.

All the samples were tested first with the CE mark TPHA assay and then with the Bio-Rad TPHA 500 assay (72504).

Sensitivity on this population is found at **100% (435/435)** with a 95% confidence interval at [99.2%-100.0%].

9.3. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity was tested against the WHO International Standard for Syphilis NIBSC code 05/132. Using the semi-quantitative protocol, the sensitivity was found at 0.05 IU/mL.

9.4. Analytical Specificity / Cross Reactivity Study

210 potentially interfering samples containing antibodies against pathogens that could lead to infectious illnesses (Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, VZV, Rubella virus, Hepatitis C virus, Hepatitis B virus, HIV 1/2, HTLV 1/2, *Toxoplasma gondii*, Dengue, Malaria, Leptospirosis), samples from pregnant women and multiparous women or samples from patients with immune system disorders (autoantibodies (SLE), Rheumatoid factors), were tested with the TPHA assay. Four (4) true positive samples were discarded from the calculation.

One sample was found repeatable positive with the TPHA test.

The specificity observed on this target population of 99.5 % (205/206) was similar to the specificity of clinical samples.

9.5. Prozone Effect

The existence of a possible prozone effect was studied by testing 3 samples with high titers ($\geq 1:20480$) at different dilutions. The equivalence of results observed among non-diluted and diluted samples indicates the absence of the prozone effect.

10. BIBLIOGRAPHY REFERENCES

1. Daguet G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995 ; 120 :5-30.
2. Houn H. - Syphilis: new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992; 3 : 391- 413.8.
3. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981 ; 14 : 441 – 445.
4. North MLet Guntz Ph. Serodiagnostic de la syphilis. La Revue Française des Laboratoires, 1997 ; 294 : 51-58.
5. Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. – Treponematoses : aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol. 1991a ; 23 : 88-89.
6. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDT/RES 1965 ; 77 : 65.
7. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5.
8. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973 ; 49 : 242-8.

9. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis: a review. Genitourin Med. 1992 ; 68 : 413-9.
10. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. Clin Chem Lab Med. 2009. 47:596-606.
11. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308, 1966.
12. Tomizawa T. Kasamatsu S. Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969 ; 22 : 341-50.



Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00
Fax: +33 (0)1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



2014/12
883683

**Набор реагентов для определения антител к *Treponema pallidum* в
сыворотке и/или плазме крови человека с помощью РПГА
(реакция пассивной гемагглютинации) –**

ТРНА.

Исполнения:

ТРНА - 200 тестов

ТРНА - 500 тестов

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

BIO-RAD

ТРНА

 200
 500

 72503
 72504

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К *TREPONEMA PALLIDUM* В СЫВОРОТКЕ И/ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ РПГА (РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ)

 **CE**

 883683 - 2014/12

BIO-RAD

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
2. ОБЗОР И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	3
3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	3
4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	4
5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	4
6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	5
7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
8. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	10
10. БИБЛИОГРАФИЯ.....	11

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ТРНА предназначен для качественного и/или полуколичественного определения антител к *Treponema pallidum* в сыворотке и/или плазме крови человека с помощью реакции пассивной гемагглютинации при обследовании доноров и пациентов на наличие сифилитической инфекции.

2. ОБЗОР И ОБЪЯСНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

Сифилис – это хроническое инфекционное заболевание, которое в своем развитии проходит несколько четко различимых стадий: первичный, вторичный, третичный и четвертичный сифилис. На этих стадиях происходит развитие различных клинических симптомов, наиболее характерными из которых являются образование первичных язв, так называемых шанкров, затем – появление сифилитической сыпи, за которым следует продолжительный латентный период без каких-либо видимых клинических проявлений. Инфекция при отсутствии лечения может вызывать нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы и нейросифилис.

Возбудителем данной инфекции является спирохета *Treponema pallidum*. Заражение обычно происходит при половом контакте, однако болезнь может передаваться и при переливании инфицированной крови. Кроме того, возможно развитие внутриутробной инфекции. Было установлено, что данный микроорганизм практически невозможно выращивать на искусственных питательных средах, и диагностика инфекции обычно основывается на выявлении антител в крови, которые появляются вскоре после первоначального заражения и могут персистировать в ней в течение многих лет.

Выделяют четыре категории исследований на наличие сифилиса: прямое микроскопическое исследование, трепонемные антительные тесты, нетрепонемные антительные тесты и прямые антигенные тесты. В связи с наличием продолжительных латентных периодов заболевания и ввиду неспецифической природы антител, выявляемых с помощью нетрепонемных тестов, при проведении скрининговых исследований все чаще используются тесты, основанные на определении специфических анти-трепонемных антител в образцах крови. Одним из таких тестов является ТРНА.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В наборах ТРНА использованы стабилизированные птичьи эритроциты, покрытые антигеном *T. pallidum* (штамм Николса), которые связывают специфические антитела, присутствующие в сыворотке или плазме крови пациента. Клетки представлены в виде суспензии в среде, которая содержит компоненты, способные устранять неспецифические реакции.

Положительные реакции характеризуются агглютинацией клеток, отрицательные реакции – осаждением клеток на дне лунки в виде пуговки или маленького кольца.

Несмотря на то, что данные наборы предназначены для проведения, прежде всего, качественного анализа, они могут быть использованы и для определения уровня антител посредством их титрования последовательным двукратным разведением.

Интерпретация картины агглютинации осуществляется на основании результатов визуальной оценки.

4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

4.1. Описание

Наименование реагента		Описание	Варианты исполнения	
			72503 200 тестов	72504 500 тестов
R1	Сенсибилизированные клетки (Test Cells)	Сенсибилизированные клетки Суспензия птичьих эритроцитов, покрытых антигенами <i>T. pallidum</i> , содержащая бычий сывороточный альбумин (БСА)	7,8 мл/флакон 2 шт	20 мл/флакон 2 шт
R2	Контрольные клетки (Control Cells)	Контрольные клетки Суспензия птичьих эритроцитов, содержащая БСА	7,8 мл/флакон 2 шт	20 мл/флакон 1 шт
R3	Раствор для разведения (Diluent)	Раствор для разведения Солевой раствор, содержащий кроличью сыворотку	20 мл/флакон 2 шт	125 мл/флакон 1 шт
R4	Положительный контрольный образец (Positive Control)	Положительный контрольный образец Человеческая сыворотка, содержащая антитела к <i>T. pallidum</i> , отрицательная по HBs антигену, анти-ВИЧ 1/2 и анти-ВГС антителам, разведенная в фосфатном буферном растворе	1 мл/флакон 1 шт	1 мл/флакон 1 шт
R5	Отрицательный контрольный образец (Negative Control)	Отрицательный контрольный образец Кроличья сыворотка, разведенная в фосфатном буферном растворе	1 мл/флакон 1 шт	1 мл/флакон 1 шт

4.2. Условия хранения и использования

Данный набор должен храниться при температуре +2-8°C. Хранить флаконы в вертикальном положении. Не замораживать.

Каждый компонент набора, хранящийся при температуре +2-8°C, может быть использован до окончания срока годности, указанного на упаковке. После вскрытия флаконов и в отсутствие контаминации реагенты R1, R2, R3, R4 и R5, хранящиеся при +2-8°C, могут быть использованы до окончания срока годности, указанного на этикетке.

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *in vitro*. Предназначено для профессионального применения медицинскими работниками.

5.1. Меры по обеспечению безопасности и охраны здоровья:

- Данный набор реагентов предназначен для использования только квалифицированными специалистами, прошедшими специальное обучение в области проведения лабораторных исследований и осведомленными о связанных с ними потенциальных факторах риска. Следует использовать специальную защитную одежду, перчатки и средства для защиты глаз/лица и должным образом соблюдать соответствующие Принципы надлежащей лабораторной практики.

- Набор содержит компоненты, которые изготовлены на основе сыворотки крови человека. Все они прошли исследование на этапе забора крови у доноров и определены как отрицательные по наличию HBs антигена, анти-ВИЧ 1/2 и анти-ВГС антител. Однако методов, способных обеспечить полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, не существует. Поэтому со всеми производными крови человека, реагентами и биологическими образцами, полученными от человека, следует обращаться как с потенциально способными к передаче инфекции, соблюдая универсальные меры безопасности в отношении гемотрансмиссивных патогенов, определенные в местных, региональных и национальных нормативных актах.
- Разлитый биологический материал человеческого происхождения должен быть обработан как потенциально инфицированный.
Если пролитый материал не содержит кислоты, необходимо незамедлительно провести обработку участка пролива, всех материалов, всех загрязненных поверхностей и оборудования соответствующим химическим дезинфицирующим средством, которое является эффективным в отношении потенциальной биологической опасности рассматриваемых образцов (как правило, гипохлорит натрия в разведении 1:10, 70-80 % этиловый или изопропиловый спирт, йодофор, например, 0,5 % Wescodyne Plus и т. д.), а затем вытереть насухо.

Разлитые материалы, содержащие кислоту, необходимо тщательно устранить при помощи впитывающего материала (вытереть) или нейтрализовать, участок разлива промыть водой и вытереть насухо. Сорбирующие материалы, использованные для удаления разлитой жидкости, следует утилизировать согласно требованиям к обращению с биологически опасными отходами. Затем этот участок необходимо обработать одним из химических дезинфицирующих средств.

Примечание: Не помещайте хлорсодержащие растворы в автоклав!

- Все образцы и материалы, использованные для проведения теста, должны быть утилизированы как вещества, потенциально содержащие возбудителей инфекции. Обращение с лабораторными, химическими и биологически опасными отходами, а также их утилизация, должны осуществляться с соблюдением всех местных, региональных и национальных нормативных требований.
- Паспорт безопасности материала представлен на интернет-сайте www.bio-rad.com

5.2. Предупреждения, касающиеся выполнения методики

5.2.1. Подготовка

Достоверность результатов обусловлена точным выполнением следующих правил Надлежащей лабораторной практики:

- При постановке теста не смешивать и не использовать совместно реактивы из различных партий.
- Не использовать реактивы с истекшим сроком годности.
- Перед использованием реактивы необходимо выдержать в течение 30 минут при комнатной температуре (18-30°C) для их стабилизации.

5.2.2. Процедура

- Не вносить изменений в процедуру исследования.
- Использовать новый наконечник для внесения каждой пробы.

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы сыворотки или плазмы (собранной с ЭДТА, цитратом натрия, гепарином или цитратным антикоагулянтом с декстрозой) не должны содержать клеточных элементов крови и не иметь явных признаков загрязнения микроорганизмами. Образцы могут храниться при температуре +2-

8°C в течение 7 дней перед проведением теста. Образцы, требующие более длительного хранения, следует замораживать при -20°C или более низкой температуре.

Перед тестированием замороженные образцы необходимо разморозить и хорошо перемешать. Не следует подвергать образцы процедуре замораживания-оттаивания более 5 раз. Образцы, подвергшиеся нагреванию при температуре 56 °C в течение 3 часов, пригодны для проведения исследования.

Содержание в образце до 100 мг/л билирубина, до 36 г/л триглицеридов и до 10 г/л гемоглобина не влияет на результат. Однако не рекомендуется использовать для исследования сильно гемолизированную сыворотку или плазму, а также сыворотку или плазму с очень высоким содержанием липидов.

Если образцы подлежат транспортировке, их необходимо упаковать в соответствии с действующими правилами транспортировки этиологических агентов, предпочтительно транспортировать в замороженном виде.

7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ: Положительный и отрицательный контрольные образцы (R4 и R5), входящие в набор, должны использоваться в каждой постановке теста.

7.1. Необходимые материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная вода
- Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия
- Фильтровальная бумага
- Одноразовые перчатки
- Защитные очки
- Одноразовые пробирки
- Автоматические или полуавтоматические пипетки с варьируемым или постоянным объемом, либо многоканальные пипетки для отбора и внесения различных объемов жидкости (10 мкл, 25 мкл, 75 мкл и 190 мкл).
- Шейкер для микропланшетов
- Микропланшеты на 96 лунок с U-образным дном
- Контейнер для биологически опасных отходов

7.2. Методика проведения исследования (ручной метод)

7.2.1. Качественный анализ

Для каждого образца необходимо использовать три круглодонные лунки на микропланшете.

Набор ТРНА 500 (Кат№ 72504) предназначен для скринингового исследования значительного количества образцов, но содержит лишь небольшой объем контрольных клеток. Предполагается, что при исследовании образцов в первой постановке должны использоваться только сенсibilизированные клетки, контрольные же клетки следует использовать при повторной постановке теста, которая осуществляется в случае получения положительных результатов первоначального теста.

а. Разведение образцов и контролей (1 к 20)

Внести 190 мкл раствора для разведения (R3) в лунку.

Добавить 10 мкл образца или положительного контрольного образца (R4) или отрицательного контрольного образца (R5) в ту же самую лунку.

Тщательно перемешать.

б. Выполнение теста

Перенести 25 мкл разведенного контрольного образца или разведенного образца из лунки для разведения в лунку для тестирования.

Перенести 25 мкл разведенного контрольного образца или разведенного образца из лунки для разведения в контрольную лунку.

Встряхивая флаконы, ресуспендировать сенсibilизированные клетки (R1) и контрольные клетки (R2). Убедиться, что клетки полностью ресуспендированы.

Внести 75 мкл сенсibilизированных клеток (R1) в лунку для тестирования и 75 мкл контрольных клеток (R2) в контрольную лунку.

Конечное разведение образца составляет 1: 80.

Тщательно перемешать содержимое лунок.

Инкубировать при комнатной температуре (15-30 °C) на поверхности, не подвергающейся воздействию вибрации, в течение минимум 45 минут.

Оценить картину клеточной агглютинации. Эта картина остается неизменной в течение, по меньшей мере, трех часов при условии, что микропланшет находится в состоянии покоя.

7.2.2. Полуколичественный анализ

Для каждого образца необходимо использовать 9 круглодонных лунок на микропланшете: одна лунка для разведения образца или контрольного образца и 8 лунок – для титрования.

Примечание: Положительный и отрицательный контрольные образцы (R4 и R5) должны быть включены в постановку каждой серии тестов с использованием описанной ниже процедуры.

а. Разведение образцов и контрольных образцов (1 к 20)

Внести 190 мкл раствора для разведения (R3) в лунку.

Добавить 10 мкл образца или отрицательного контрольного образца (R5) или положительного контрольного образца (R4) в ту же самую лунку.

Тщательно перемешать.

б. Титрование

Оставить первую лунку пустой, внести по 25 мкл раствора для разведения (R3) в каждую из оставшихся 7 лунок.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 мкл (R3) + 10 мкл Образец или (R4) или (R5)		25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3
Разведения образцов и контрольных образцов	8 лунок для титрования							

Перенести 25 мкл разведенного контроля или образца в первую лунку и во вторую лунку, затем перемешать.

После чего осуществить серийные разведения во всей последовательности лунок, удалив из последней лунки лишние 25 мкл.

		25мкл	25мкл	25мкл	25мкл	25мкл	25мкл		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	Удалить лишние 25 мкл
190 мкл (R3) + 10 мкл Образец или (R4) или (R5)	25 мкл разв. контр. образца	25 мкл R3 + 25 мкл разв.. контр. образца	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	
Разведения образцов и контрольных образцов	8 лунок для титрования								

с. Выполнение теста

Аккуратно перемешать сенсibilизированные клетки (R1) для обеспечения полного ресуспендирования.

Добавить 75 мкл сенсibilизированных клеток (R1) в каждую лунку.

Конечное разведение образца после добавления клеток варьирует в диапазоне от 1:80 до 1:10240.

Тщательно перемешать.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 мкл (R3) + 10 мкл Образец или (R4) или (R5)	25 мкл разв. контр. образца + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Разведения образцов и контр. образцов	8 лунок для титрования							

Инкубировать при комнатной температуре (15-30°C) на поверхности, не подвергающейся воздействию вибрации, в течение минимум 45 минут.

Оценить картину клеточной агглютинации. Эта картина остается неизменной в течение, по меньшей мере, трех часов при условии, что планшет находится в состоянии покоя.

Титром образца следует считать самое большое разведение, при котором происходит агглютинация.

7.3. Контроль качества

Исследование контрольных образцов в составе набора должно давать правильные результаты: отрицательный контрольный образец (R5) – отрицательная реакция, положительный контрольный образец (R4) – положительная.

Когда входящий в состав набора положительный контрольный образец (R4) раститрован, ожидаемое конечное разведение, дающее положительную реакцию, составляет 1:640 - 1:5120.

7.4. Интерпретация результатов и критерии оценки правильности выполнения теста



Положительный

Неопределенный

Отрицательный

Результат	Сенсibilизированные клетки	Контрольные клетки
Положительный: ярко выраженная реакция	Дно лунки покрыто гладким слоем клеток.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Слабо-положительный	Клетки покрывают около 1/3 поверхности дна лунки.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Неопределенный	Клетки сосредоточены ближе к центру в форме круга с широким центром.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Отрицательный	В центре рабочей ячейки формируется плотная пуговка из клеток, как правило, с очень маленьким отверстием в середине.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Неспецифическая реакция	Положительная реакция.	Положительная реакция

Если при исследовании образца в лунке с сенсibilизированными клетками не наблюдается реакции, то такой образец считается **отрицательным на наличие *T. pallidum***.

Реактивность меньше той, что указана как «неопределенная», свидетельствует об отрицательном результате теста.

Любой образец, результаты исследования которого можно оценить как неопределенные или положительные, должен рассматриваться как положительный и подвергнуться повторному исследованию в соответствии с описанным выше протоколом, но в двух повторях, при этом в одну серию ячеек необходимо добавить контрольные клетки (R2), а в другую – сенсibilизированные клетки (R1).

Если хотя бы в одной из лунок с сенсibilизированными клетками (R1) результат окажется неопределенным или положительным, образец должен считаться **положительным на наличие *T. pallidum***.

При наличии неспецифической реакции, картина агглютинации должна оцениваться следующим образом: если агглютинация более выражена у сенсibilизированных клеток (R1), чем у контрольных (R2), образец расценивается как положительный и должен быть подвергнут повторному исследованию.

Если же при исследовании такого образца наблюдается более выраженная или сопоставимая агглютинация у контрольных клеток (R2), образец необходимо абсорбировать, следуя нижеописанной методике.

7.5. Абсорбция неспецифических реакций

(Процедура проводится в том случае, когда наблюдается агглютинация и сенсibilизированных, и контрольных клеток).

1. Добавить 10 мкл образца к 190 мкл ресуспендированных контрольных клеток, хорошо перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
2. Центрифугировать до осаждения клеток при минимум 1500g в течение 3 минут.
3. Внести по 25 мкл супернатанта, полученного в ходе выполнения этапа 2, в каждую из двух лунок.
4. Аккуратно перемешать сенсibilизированные и контрольные клетки для обеспечения достаточного ресуспендирования.
Добавить 75 мкл сенсibilизированных клеток в первую лунку.
Добавить 75 мкл контрольных клеток во вторую лунку.
5. Тщательно перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение минимум 45 минут.
6. Оценить и интерпретировать картину клеточной агглютинации, согласно описанной выше схеме.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

Отдельные тесты или точно определенные эталонные стандарты для каждой из стадий заболевания отсутствуют. Поэтому диагностика сифилиса опирается, преимущественно, на серологическое исследование, для чего требуются результаты как нетрепонемных, так и трепонемных тестов.

Ни один из диагностических тестов не может дать абсолютной гарантии, что в образце не содержатся антитела к *T. pallidum* в низкой концентрации, как, может, например, происходить на самой ранней стадии заболевания. Следовательно, отрицательный результат, полученный в какой-либо момент времени, не исключает вероятности заражения сифилисом.

Как правило, результаты всех трепонемных тестов остаются положительными и после проведения терапии трепонемной инфекции, поэтому эти тесты не могут быть использованы для оценки ответа на лечение. Поскольку реактивность сохраняется практически в течение всей жизни пациента, трепонемные тесты не являются достоверным методом выявления рецидива или повторного инфицирования у людей, ранее имевших положительные результаты такого исследования. В данном случае рекомендуется использовать другие методики анализа и соответствующие наборы: Syphilis Total Ab, Syphilis IgM EIA и RPR.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1. Исследование воспроизводимости

Исследование воспроизводимости заключалось в проведении анализа 3 образцов (1 отрицательный, 1 слабоположительный и 1 положительный) в 10 повторах в одной и той же постановке теста (сходимость) и в 2 повторах в течение 5 дней, с применением реактивов из 2 различных партий и с привлечением 2 различных специалистов для оценки результатов (внутрилабораторная воспроизводимость).

Сходимость: при исследовании всех 3 образцов десять раз были получены идентичные результаты.

Внутрилабораторная воспроизводимость/ воспроизводимость между партиями: в ходе анализа всех 3 образцов, проводимого в различных условиях (40 раз), были получены идентичные результаты.

9.2. Клинические характеристики

Характеристики метода ТРНА определялись посредством оценки образцов, полученных у произвольно выбранных доноров крови, госпитализированных пациентов и пациентов, зараженных сифилисом, а также образцов, в которых были выявлены маркеры, не связанные с инфекцией *T. pallidum*.

Исследования проводились в 2 центрах донорской крови, а также в исследовательском центре Bio-Rad.

9.2.1. Специфичность

Всего было исследовано 5032 образца, полученных у доноров в 2 различных центрах в ходе проспективных исследований.

Среди образцов была как сыворотка (3626), так и плазма, собранная с ЭДТА К2 (539) или с литий-гепарином (867). Образцы исследовались в течение менее чем 7 дней, следующих за датой забора крови, и результаты сравнивали с результатами скринингового исследования, проводимого в лаборатории.

Таблица 1: Популяция доноров крови

Центр	Кол-во	Первично реактивные образцы (IR)	Повторно реактивные образцы (RR)	Специфичность (%)	95% Доверительный интервал (%)
Центр № 1	2519	18	7	99,72% (2512/ 2519)	99,43% – 99,89%
Центр № 2	2513*	20	7	99,72% (2505 / 2512)	99,43% – 99,89%
Всего	5032	38 (8 положительных, 30 неопределенных)	14 (3 положительных, 11 неопределенных)	99,72% (5017/5031)	99,53% – 99,85%

*:один образец (истинно положительный) был исключен из подсчета.

Общая специфичность по популяции банков крови, равна **99,72% (5017/5031)**, при этом 95% доверительный интервал составляет [99,53% –99,85%]. Из 14 ложноположительных образцов 11 оказались повторно неопределенными.

Также было проведено ретроспективное исследование 201 замороженного образца, полученного от пациентов с отрицательными результатами по сифилису Центра по изучению инфекций, передающихся половым путем, или частных лабораторий.

Специфичность этих образцов составила **99,5% (200/201)** с 95% доверительным интервалом [97,3%- 100,0%].

9.2.2. Чувствительность

Исследование чувствительности проводилось на 435 ретроспективно собранных и замороженных образцах сыворотки, полученных из лаборатории Центра по изучению инфекций, передающихся половым путем, или на замороженных образцах, полученных из частных лабораторий. Эти образцы были определены как положительные при проведении иммуноанализа, исследования с применением метода флуоресцирующих трепонемных антител, проведении RPR/VDRL-тестов или исследования РПГА, в соответствии с их источником.

Все образцы сначала были исследованы при помощи СЕ сертифицированного набора для постановки РПГА, а затем – при помощи набора ТРНА 500 (72504) производства Bio-Rad.

Чувствительность в этой популяции составила **100% (435/435)** с 95% доверительным интервалом [99,2%-100,0%].

9.3. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность исследовалась в сравнении с установленным ВОЗ международным стандартом «Выявление IgG и IgM в плазме крови при наличии сифилиса», код 05/132 в системе NIBSC (Национальный институт биологических стандартов и контроля). При использовании протокола полуколичественного определения, чувствительность составила 0,05 МЕ/мл.

9.4. Аналитическая специфичность / Исследование перекрестной реактивности

210 образцов с потенциальной интерференцией, содержащих антитела к патогенам, которые могут привести к развитию инфекционного заболевания (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус ветряной оспы, вирус краснухи, вирус гепатита С, вирус гепатита В, ВИЧ 1/2, вирус HTLV 1/2, *Toxoplasma gondii*, возбудители лихорадки Денге, малярии, лептоспироза), образцов, полученных у беременных женщин и многократно рожавших женщин, или образцов, полученных у пациентов с заболеваниями иммунной системы (аутоиммунные антитела (СКВ), ревматоидный фактор), было исследовано при помощи ТРНА. Четыре (4) истинно положительных образца были исключены из подсчета.

Один образец оказался положительным и при повторном проведении исследования РПГА.

Специфичность в данной целевой выборке составила **99,5 % (205/206)**, что сопоставимо со специфичностью на клинических образцах.

9.5. Феномен прозоны (хук-эффект)

Вероятность существования феномена прозоны была исследована посредством тестирования 3 образцов с высокими титрами ($\geq 1:20480$) в различных разведениях. Идентичность результатов, полученных при тестировании неразведенных и разведенных образцов, свидетельствует об отсутствии феномена прозоны.

10. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Daguet G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995; 120:5-30.
2. Houn H. - Syphilis: new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992; 3: 391- 413.8.
3. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981; 14: 441 –445.
4. North MLet Guntz Ph. Serodiagnostic de la syphilis. La Revue Francaise des Laboratoires, 1997; 294: 51-58.
5. Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. – Treponematoses: aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol.1991a; 23: 88-89.
6. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDT/RES 1965; 77: 65.

7. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967; 43: 181-5.
8. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973; 49: 242-8.
9. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis: a review. Genitourin Med. 1992; 68: 413-9.
10. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. Clin Chem Lab Med. 2009. 47:596-606.
11. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci.Biol. 19, 305-308, 1966.
12. Tomizawa T. Kasamatsu S. Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969; 22: 341-50.

Bio-Rad Био-Рад
3, boulevard Raymond Poincare
92430 Marnes-la-Coquette, France
Тел.: +33 (0)1 47 95 60 00
Факс: +33 (0)1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



2014/12
883683

ПРИЛОЖЕНИЕ

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Показания к применению медицинского изделия

Качественное и/или полуколичественное определение антител к *Treponema pallidum* в сыворотке и/или плазме крови человека с помощью реакции пассивной гемагглютинации при обследовании доноров и пациентов на наличие сифилитической инфекции.

Противопоказания

При строгом соблюдении инструкции по применению противопоказаний к применению данного медицинского изделия нет.

Побочные действия

Не применимо для данного МИ

Область применения

Только для диагностики in vitro.

Условия хранения и использования (Дополнение)

Данный набор должен храниться при температуре +2-8°C (в холодильнике, холодильной камере).

Хранить флаконы в вертикальном положении. Не замораживать.

Каждый компонент набора, хранящийся при температуре +2-8°C, может быть использован до окончания срока годности, указанного на упаковке. После вскрытия флаконов и в отсутствие контаминации реагенты R1, R2, R3, R4 и R5, хранящиеся при +2-8°C, могут быть использованы до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Условия транспортирования

Изделие следует перевозить в оригинальной упаковке производителя, защищающей продукцию от внешних воздействий, на всех видах транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Температурный режим: 2-8 °C

При проведении погрузочно-разгрузочных работ и транспортировании следует строго выполнять требования манипуляционных знаков, нанесенных на упаковке и транспортной таре.

При несоблюдении условий транспортирования медицинское изделие не подлежит использованию!

Предупреждения и меры предосторожности (Дополнение)

В состав некоторых реагентов входит азид натрия. Концентрация вещества менее 0,1%.

В директиве № 1272/2008 (CLP - классификация, маркировка и упаковка) не представлены токсикологические данные для смесей, содержащих азид натрия. Следовательно, в соответствии с рекомендациями CLP, оценка острой токсичности рассчитывается из токсичности ингредиентов. При используемых в смесях концентрациях вещества <0,1%, смеси не классифицируются как опасные.

Однако, азид натрия может вступать в химические реакции со свинцом или медью водопроводных труб, образуя чрезвычайно взрывоопасные азиды данных металлов. Для предотвращения накопления азидов, следует смывать удаляемые жидкости большим количеством воды.

Клинические характеристики (Дополнение)

В ходе клинических испытаний (в форме клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия с целью регистрации МИ), проведенных ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», проанализировано 300 образцов клинического материала от 68 женщин и 32 мужчин в возрасте от 10 до 87 лет (от каждого пациента были получены образцы сыворотки и плазмы с различными заявленными антикоагулянтами). 100 образцов сыворотки, 50 образцов плазмы с ЭДТА, 50 образцов плазмы с цитратом натрия, 50 образцов плазмы с гепарином натрия и 50 образцов плазмы с АСД были исследованы для оценки чувствительности и специфичности испытуемого медицинского изделия в сравнительных испытаниях с использованием зарегистрированного в РФ изделия сравнения.

Чувствительность для испытуемого МИ ИВД составила **100%** (доверительный интервал 97,57% - 100%, с доверительной вероятностью 95%), специфичность для испытуемого МИ ИВД составила **100%** (доверительный интервал 97,57% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).

По результатам клинических испытаний установлена эффективность, качество и безопасность МИ Набор реагентов для определения антител к *Treponema pallidum* в сыворотке и/или плазме крови человека с помощью РПГА (реакция пассивной гемагглютинации) – ТРНА,, производства Bio-Rad (Био-Рад), Франция.

Утилизация

Утилизация изделия должна производиться в соответствии с требованиями локального, регионального и национального законодательства.

Все образцы и материалы, использующиеся и образующиеся при выполнении исследований, в том числе реагенты с истекшим сроком годности, следует утилизировать как потенциально эпидемиологически опасные отходы (класс Б).

Гарантии

Производитель гарантирует соответствие характеристик медицинского изделия заявленным в эксплуатационной документации при условии применения изделия в соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренному производителем.

По всем вопросам, для получения технической консультации и поддержки следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

ООО «Био-Рад Лаборатории»

Адрес: 105064, г. Москва, Нижний Сусальный переулок, дом 5, строение 5А.

Телефон: +7 (495) 721-14-04



Belvie FERNET
Regulatory Affairs Manager
Date: June 5, 2019.

[Handwritten signature]

Vu pour certification
matérielle de la signature
de M. Belvie FERNET
apposée ci-dessus
PARIS, le 06.06.2019
Cette certification de signature(s) ne peut en
aucun cas conférer au présent document le
caractère d'un acte authentique.
La responsabilité du Notaire ne peut à aucun
titre être mise en cause et se limite au contenu
du présent document.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
97420 La Trinité-Moquette - France
Tél : 789 947 322 00010



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par... Mc CHEVAL

3. agissant en qualité de... Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de... Son étude

Attesté

5. à Paris

6. le...

06 JUIN 2019

7. par le Procureur général... Michel LERNOUT

8. sous n° 22049-1

9. Sceau

Michel LERNOUT
PREMIER AVOCAT GÉNÉRAL

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou
timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est
correct ou que la République française approuve son contenu"

(Гербовая печать)
Кристоф Шеваль, помощник нотариуса
Париж

Сильвия ФЕРНЕЗ
Руководитель по вопросам нормативного регулирования
Дата: 05 июня 2019 г.
(Подпись)

(Штамп)
Био-Рад
бульвар Раймона Пуанкаре, 3
92430, г. Марн-ля-Кокетт – Франция
Siret: 789 947 322 00010

(Штамп)
Свидетельствую верность подписи г-жи Сильвии Фернез, поставленной в г. Париже 11.06.2019.
Свидетельствование верности подписи не подтверждает верность и подлинность подписанного документа. Нотариус не несет ответственности за содержание такого документа.
(Подпись)

(Гербовая печать)
Кристоф Шеваль, помощник нотариуса
Париж

(Гербовая печать)
Апелляционный суд Парижа

АПОСТИЛЬ

(в соответствии с Гаагской Конвенцией от 05 октября 1961 г.)

1. Страна: Французская Республика Для РОССИИ
Настоящий официальный документ
2. Подписан **г-ном ШЕВАЛЕМ**
3. действующим(-ей) в качестве **нотариуса**
4. скреплен печатью/штампом **вышеуказанного нотариуса**

Удостоверено

5. в Париже
6. **10 июля 2019 г.**
7. *Генеральным прокурором апелляционного суда Парижа*
8. за номером **22049-1**
9. Печать/штамп:
10. Подпись:

(Гербовая печать)
Апелляционный суд Парижа

(Подпись)
Мишель Лерну
Первый заместитель генерального
прокурора

Настоящий апостиль удостоверяет только подлинность подписи, печати или штампа, которыми он скреплен. Он не удостоверяет содержание документа и не означает утверждения его содержания Французской Республикой.

Перевод данного текста сделан мной, переводчиком Алексеевым Алексеем Александровичем.



Российская Федерация

Город Москва

Двадцать пятого июля две тысячи девятнадцатого года

Я, Ребрина Елена Дмитриевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Акимов Глеба Борисовича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Алексеева Алексея Александровича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

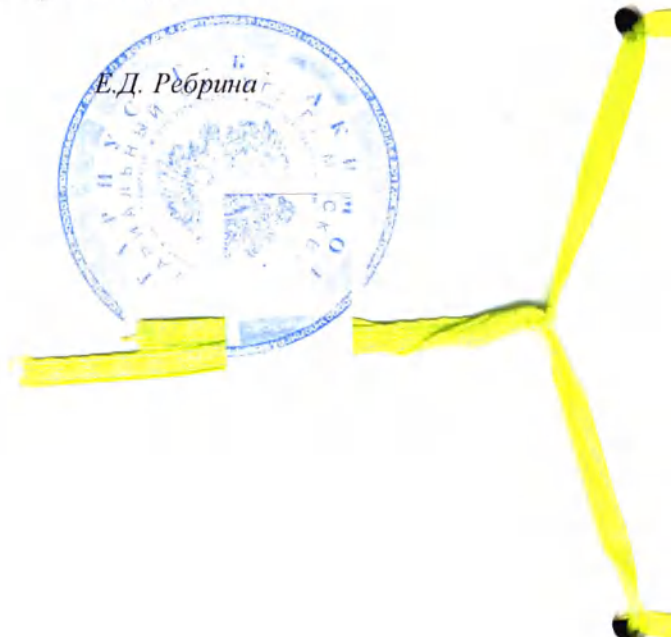
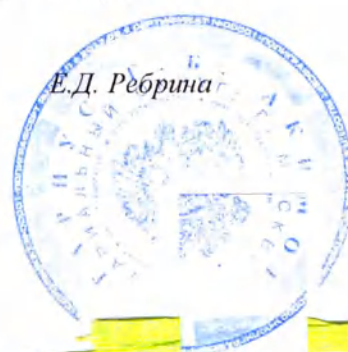
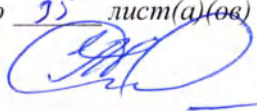
Зарегистрировано в реестре: № 77/09-н/77-2019- 60-3035

Взыскано государственной пошлины(по тарифу): 100 руб.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 200 руб.

Всего пронумеровано, пронумеровано
и скреплено печатью 25 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса



«СОГЛАСОВАНО»

Руководитель отдела
клинико-диагностических технологий
ООО "Био-Рад Лаборатории"



«28» марта 2019 г.

/ О. Ю. Луценко

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ»
Шестаков А. Я.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор направления
«Клинические исследования», Россия/СНГ
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»



Я.Э. Новикова
«25» марта 2019 г.

М.П.

Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

Набор реагентов для определения антител к *Treponema pallidum* в сыворотке
и/или плазме крови человека с помощью РПГА (реакция пассивной
гемагглютинации) – ТРНА

Исполнение ТРНА – 200 тестов

Исполнение ТРНА – 500 тестов

Био-Рад (Bio-Rad), Франция

TPHA

KITS FOR THE QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE DETECTION OF
ANTIBODY TO *TREPONEMA PALLIDUM* IN HUMAN SERUM OR PLASMA
BY PASSIVE HAEMAGGLUTINATION

TPHA - 200 tests

TPHA - 500 tests

INSTRUCTION FOR USE

BIO-RAD

ТРНА

Σ 200

REF 72503

Σ 500

REF 72504

-
- (BG) • Други езици можете да получите от представителя на Bio-Rad. Задължително използвайте варианта на листовката, описан върху опаковката (i).
- (CZ) • Ostatní požadované jazyky jsou k dispozici u vašeho místního prodejce Bio-Rad. Používejte pouze verzi příbalového letáku uvedenou na obalu (i).
- (DE) • Andere Sprachen sind auf Anfrage von Ihrer Bio-Rad-Vertretung vor Ort erhältlich. Es ist zwingend die auf der Schachtel genannte Version der Packungsbeilage zu verwenden (i).
- (DK) • Hvis der ønskes andre sprog, kan de fås hos den lokale Bio-Rad-repræsentant. Indlægssedlen, som er angivet på kassen, skal altid anvendes (i).
- (EE) • Teistes keeltes juhendi saate soovi korral kohalikult Bio-Rad esindajalt. Kohustuslik on kasutada karbil mainitud pakendi infolehe versiooni (i).
- (EN) • Other requested languages can be obtained from your local Bio-Rad agent. Imperatively use the package insert version mentioned on the box (i).
- (ES) • Puede solicitar otros idiomas a su agente local Bio-Rad. Utilice obligatoriamente el paquete adjunto, versión indicada en la caja (i).
- (FI) • Muita kieliä on saatavilla omalta Bio-Rad -edustajaltanne. Käytä ehdottomasti laatikossa mainittua tuoteselosteversiota (i).
- (FR) • Pour obtenir d'autres langues, contacter votre agent Bio-Rad. Utiliser obligatoirement la version de la notice mentionnée sur la boîte (i).

BIO-RAD

- (GR)** • Τις άλλες απαιτούμενες γλώσσες μπορείτε να τις πάρετε από τον τοπικό πράκτορά σας Bio-Rad. Χρησιμοποιήστε οπωσδήποτε την παραλλαγή ένθετου συσκευασίας που αναγράφεται στο κουτί (i).
- (HR)** • Ostali traženi jezici mogu se dobiti od lokalnog Bio-Rad agenta. Potrebno je koristiti onu verziju uputstva za upotrebu koja je navedena na kutiji (i).
- (HU)** • Egyéb nyelveken a helyi Bio-Rad képvisellettől szerezhető be. A dobozon szereplő verziószámú tájékoztatót kell kötelező érvénnyel használni (i).
- (IT)** • E' possibile avere i Manuali di Istruzioni in altre lingue richiedendoli al collaboratore Bio-Rad di zona. Utilizzare tassativamente il manuale di istruzioni della versione citata sulla confezione (i).
- (LT)** • Informaciją gimtąja kalba galima gauti iš vietinio „Bio-Rad“ atstovo. Privaloma naudoti įdėtinę paketo versiją, nurodytą ant dėžutės (i).
- (MT)** • Lingwi oħrajn mitlubin jistgħu jinkisbu mingħand l-aġent ta' Bio-Rad lokali tiegħek. Huwa mistenni li tuża l-verżjoni tal-fuljett ta' tagħrif imsemmija fuq il-kaxxa (i).
- (NL)** • Andere gevraagde talen kunnen worden verkregen bij uw plaatselijke Bio-Rad agent. Gebruik uitsluitend de op de doos vermelde versie van de bijsluiter (i).
- (NO)** • Andre etterspurte språk kan fås fra din lokale Bio-Rad representant. Om nødvendig bruk pakningsvedlegget som følger med (i).
- (PL)** • Informację w innych językach można otrzymać u miejscowego przedstawiciela firmy Bio-Rad. Należy bezwzględnie zapoznać się z ulotką dołączoną do produktu wskazaną na opakowaniu (i).
- (PT)** • É possível obter outros idiomas solicitados junto da sua agência Bio-Rad local. Consulte obrigatoriamente a versão do folheto informativo referida na embalagem (i).
- (RO)** • Alte limbi solicitate pot fi obținute de la agentul dumneavoastră local Bio-Rad. Este imperativ să utilizați versiunea prospectului menționată pe cutie (i).
- (SE)** • Andra språk kan fås av din lokala Bio-Rad-återförsäljare. Använd alltid den version av bipacksedeln som anges på förpackningen (i).
- (SI)** • Druge želene jezike lahko dobite pri krajevnem zastopniku Bio-Rad. Obvezno uporabite različico navodil za uporabo, navedeno na škatli (i).
- (SK)** • Ďalšie jazyky si môžete vyžiadať u svojho miestneho zástupcu Bio-Rad. Bezpodmienečne používajte verziu príbalového letáku uvedenú na škatuli (i).

TPHA

 200

 72503

 500

 72504

KITS FOR THE QUALITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE
DETECTION OF ANTIBODY TO *TREPONEMA*
PALLIDUM IN HUMAN SERUM OR PLASMA BY
PASSIVE HAEMAGGLUTINATION

 883683 - 2014/12

BIO-RAD

TABLE OF CONTENT

1. INTENDED USE.	5
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST.	5
3. PRINCIPLES OF THE PROCEDURE.	5
4. REAGENTS.	6
5. WARNING AND PRECAUTIONS.	7
6. SPECIMENS.	8
7. PROCEDURE.	8
8. TEST LIMITATION.	12
9. PERFORMANCES CHARACTERISTICS.	13
10. BIBLIOGRAPHY REFERENCES.	15

1. INTENDED USE

TPHA kits are intended for use for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies to *Treponema pallidum* in human serum and plasma. The product may be used for the screening of blood donors, and to aid in the diagnosis of patients where syphilis infection is suspected.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Syphilis is a chronic infection that progresses through distinct stages of infection: primary, secondary, tertiary, and quaternary. These stages produce diverse clinical symptoms, typically producing initial sores known as chancres then syphilitic rash followed by long periods of dormancy. Untreated infection may eventually result in cardiovascular problems and neurosyphilis.

The infection is caused by the spirochaete *Treponema pallidum*, and is usually acquired by sexual contact, although the disease may be transmitted by transfusion of infected blood. Intrauterine infection also occurs. The organism has proved virtually impossible to culture in artificial media, and diagnosis of the infection usually depends on the demonstration of antibodies in the blood, which appear soon after initial infection and may persist for many years.

Tests for Syphilis fall into four categories: direct microscopic examination, treponemal antibody tests, non - treponemal antibody tests and direct antigen tests. Because of the long periods of dormancy and the non - specific nature of non - treponemal tests, methods that detect specific anti-treponemal antibodies in blood specimens have become increasingly popular for screening. TPHA is one such test.

3. PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

TPHA kits use preserved avian erythrocytes coated with antigens of *T. pallidum* (Nichols strain), which will bind with specific antibody present in patient's serum or plasma. The cells are suspended in a medium containing components to eliminate non - specific reactions. Positive reactions are shown by agglutination of the cells, negative reactions by the settling of the cells to a button or small ring.

Although these kits are intended for use primarily as qualitative tests, antibody levels may be titrated by doubling dilution.

Agglutination patterns may be interpreted by eye.

4. REAGENTS

4.1. Description

Identification on label		Description	Presentation 72503 72504 200 tests 500 tests	
R1	Test Cells	Test Cells Suspension of Avian erythrocytes coated with antigens of <i>T. pallidum</i> , containing Bovine Serum Albumin (BSA)	2 vials 7.8 ml	2 vials 20 ml
R2	Control Cells	Control Cells Suspension of Avian erythrocytes, containing BSA	2 vials 7.8 ml	1 vial 20 ml
R3	Diluent	Diluent Saline solution containing Rabbit serum	2 vials 20 ml	1 vial 125 ml
R4	Positive Control	Positive Control Human serum containing antibodies to <i>T. pallidum</i> , negative for HBs Antigen, anti-HIV1/2, and anti-HCV antibodies diluted in phosphate buffer	1 vial 1 ml	1 vial 1 ml
R5	Negative Control	Negative Control Rabbit serum in phosphate buffer	1 vial 1 ml	1 vial 1 ml

4.2. Storage and handling requirements

This kit should be stored at +2-8°C. **Store bottles up-right.** Do not freeze.

Each item of the kit preserved at +2-8°C can be used up to the expiry date mentioned on the package. After opening and in the absence of contamination, the R1, R2, R3, R4 and R5 reagents preserved at +2-8°C, can be used up to the expiry date shown on the label.

5. WARNING AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use. For healthcare professional use.

5.1. Health and Safety precautions:

- This test kit should be handled only by qualified personnel trained in laboratory procedures and familiar with their potential hazards. Wear appropriate protective clothing, gloves and eye/face protection and handle appropriately with the requisite Good Laboratory Practices.
- The control materials supplied are derived from human serum. They have been tested at donor level and found negative for HBs Antigen, anti-HIV1/2, and anti-HCV antibodies. No known test method can offer complete assurance that infectious agents are absent. Therefore, all human blood derivatives, reagents and human specimens should be handled as if capable of transmitting infectious disease, following recommended Universal Precautions for blood borne pathogens as defined by local, regional and national regulations.
- Biological spills: Human source material spills should be treated as potentially infectious.

Spills not containing acid should be immediately decontaminated, including the spill area, materials and any contaminated surfaces or equipment, with an appropriate chemical disinfectant that is effective for the potential biohazards relative to the samples involved (commonly a 1:10 dilution of household bleach, 70-80% Ethanol or Isopropanol, an iodophor [such as 0.5% Wescodyne™ Plus, etc.], and wiped dry.

Spills containing acid should be appropriately absorbed (wiped up) or neutralized, the area flushed with water and wiped dry; materials used to absorb the spill may require biohazardous waste disposal. Then the area should be decontaminated with one of the chemical disinfectants.

Note: Do not place solutions containing bleach into the autoclave !

- Dispose of all specimens and material used to perform the test as though they contain an infectious agent. Laboratory, chemical or biohazardous wastes must be handled and discarded in accordance with all local, regional and national regulations.
- The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

5.2. Precautions related to the procedure

5.2.1. Preparing

The reliability of the results depends on correct implementation of the following Good Laboratory Practices:

- Do not mix or associate reagents from different lots within a test run.
- Do not use expired reagents.
- Before use wait for 30 minutes for the reagents to stabilize at room temperature (18-30°C).

5.2.2. Processing

- Do not change the assay procedure.
- Use a new distribution tip for each sample.

6. SPECIMENS

Serum or plasma (EDTA, Sodium Citrate, Heparin and ACD) specimens should be free of blood cells and of obvious microbial contamination. They may be stored at +2-8°C for up to 7 days before testing. Specimens needing longer storage should be frozen at -20°C or lower. Frozen specimens should be thawed and well mixed before testing. Do not repeat more than 5 freeze/thaw cycles. Heated samples at 56°C during 3 hours do not impact the results.

Specimens containing up to 100 mg/L of bilirubin, up to 36 g/L of triglycerid and up to 10 g/L of hemoglobin do not affect the results. However, it is not recommended to use hyperlipaemic or hyperhaemolysed sera or plasma.

If the specimens are to be shipped, they must be packaged in accordance with the regulations in force regarding the transport of etiological agents and preferably transport frozen.

7. PROCEDURE

REMARK: The kit Positive and Negative Controls (R4 and R5) must be run with each run of tests.

7.1. Materials required but not provided

- Distilled water
- Sodium hypochlorite (household bleach) and sodium bicarbonate.
- Absorbent paper
- Disposable gloves
- Safety glasses
- Disposable tubes
- Automatic or semi-automatic, adjustable or preset pipettes or multipipettes to measure and dispense 10 µl, 25 µl, 75 µl and 190 µl.

- Microplate shaker
- U well plate format (96-well microplates) - Code 83375 (5 plates)
- Container for biohazardous waste

7.2. Assay Procedure (Manual technique)

7.2.1. Qualitative assay

Three wells from the U microplate are needed for each specimen.

The TPHA 500 Kit (Product No. 72504) is intended for screening large numbers of specimens and contains only a small volume of Control Cells. It is intended that specimens are screened using only Test Cells in the first instance, and the Control Cells should be used when repeating tests on specimens giving a positive result when first tested.

a. Specimen and Controls Dilution (to 1 in 20)

Add 190 µl of the diluent (R3) to one well.

Add 10 µl of specimen or Positive Control (R4) or Negative Control (R5) to the same well.

Mix thoroughly.

b. Test

Transfer 25 µl of diluted control or diluted specimen from dilution step to test well.

Transfer 25 µl of diluted control or diluted specimen dilution step to control well.

Re-suspend the Test Cells (R1) and the Control Cells (R2) by shaking the vial. Examine for complete suspension.

Add 75 µl of Test Cells (R1) to test well and 75 µl of Control Cells (R2) to the control well.

Final specimen dilution is 1: 80.

Mix wells thoroughly.

Incubate at room temperature (15-30 °C) on a vibration-free surface for a minimum of 45 minutes.

Read the settling patterns. Agglutination patterns are stable for at least three hours if undisturbed.

7.2.2. Semi-Quantitative assay

9 wells of the U microplate are needed for each specimen: One well for the specimen or control dilution and 8 wells for the titration.

Note: The Positive and Negative Controls (R4 and R5) must be run with each lot of tests, using the procedure given below.

a. Specimen and Controls Dilution (to 1 in 20)

Add 190 µl of the diluent (R3) to one well.

Add 10 µl of specimen or Negative Control (R5) or Positive Control (R4) to the same well.

Mix thoroughly.

b. Titration

Leaving the first well empty, add 25 µl of diluent (R3) to each of the remaining 7 wells.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 µl (R3) + 10 µl Specimen or (R4) or (R5)		25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3
Specimen or control dilutions	8 wells for titration							

Transfer 25 µl of diluted control or specimen to the 1st well and to the 2nd well, then mix.

Then serially dilute along the well sequence, discarding the excess 25 µl from the final well.

		25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	
		↘	↘	↘	↘	↘	↘	
0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 µl (R3) + 10 µl Specimen or (R4) or (R5)	25 µl of diluted control	25 µl of R3 + 25 µl of diluted control	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3	25 µl of R3
Specimen or control dilutions	8 wells for titration							

Discarding excess 25 µl

c. Test

Gently mix the Test Cells (R1) to ensure thorough resuspension.

Add 75 µl of Test Cells (R1) to each well.

Final specimen dilution range after addition of cells is 1: 80 – 1 :10240.

Mix thoroughly.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 µl (R3) + 10 µl Specimen or (R4) or (R5)	25 µl of diluted control + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1	25 µl of dilution + 75 µl of R1
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Specimen or control dilutions	8 wells for titration							

Incubate at room temperature (15-30°C) on a vibration-free surface for a minimum of 45 minutes.

Read the settling patterns. Agglutination patterns are stable for at least three hours if undisturbed.

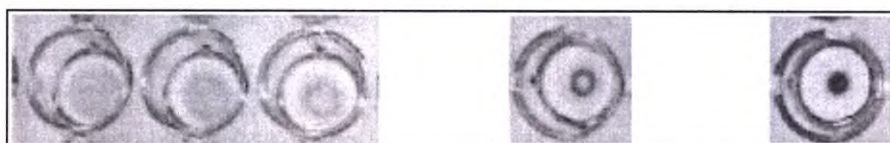
The titre of the specimen is the reciprocal of the highest dilution giving agglutination.

7.3. Quality Control

The kit Controls must give the correct result; Negative Control (R5) is negative and Positive Control (R4) is positive.

When the kit Positive Control (R4) is titrated, the expected end point is 1:640 - 1:5120.

7.4. Interpretation of the results and Test Validation criteria



Positive

Equivocal

Negative

	Test Cells	Control Cells
Positive: Strong	Full cell pattern covering the bottom of the well.	Negative button
Weak Positive	Cell pattern covers approx. 1/3 of the well bottom.	Negative button
Equivocal	Cell pattern shows a distinctly open centre.	Negative button
Negative	Cells settled to a compact button, typically with a small clear centre.	Negative button
Non-specific reaction	Positive reaction.	Positive reaction

A sample where the Test Cell well is non-reactive should be considered as **negative for *T. pallidum***.

Reactivity less than equivocal is considered negative.

Any specimen giving equivocal or positive results should be considered as positive and the test procedure repeated as above, in duplicate, adding the Control Cells (R2) provided to one set of cells and Test cells (R1) to the other.

If at least in one of the well with Test cells (R1), the result is equivocal or positive, the specimen should be considered as **positive for *T. pallidum***.

For non-specific reaction, if the agglutination is greater in the Test Cells (R1) than in the Controls Cells (R2), then the sample is considered positive and should be repeated as above.

When a sample has greater or equal agglutination in the Control Cells (R2) then the sample should be absorbed using the following procedure.

7.5. Absorption of non-specific reactions

(Procedure to be used if agglutination is seen in both Test and Control cells).

1. Add 10 µl of specimen to 190 µl of resuspended Control Cells, mix well and incubate at room temperature for 30 minutes.
2. Centrifuge to deposit the cells at a minimum of 1500g for 3 minutes.
3. Add 25 µl of supernatant from step 2 to each of 2 wells.
4. Gently mix the Test and Control Cells to ensure thorough resuspension.
Add 75 µl of Test Cells to the 1st well.
Add 75 µl of Control Cells to the 2nd well.
5. Ensure thorough mixing and incubate at room temperature for a minimum of 45 minutes.
6. Read and interpret the settling patterns as above.

8. TEST LIMITATION

No single test or definitive reference standard is available for every stage of the disease. Thus, Syphilis diagnosis relies predominantly on serological testing, requiring results from both non-treponemal and treponemal methods.

No diagnostic test provides absolute assurance that a sample does not contain low levels of antibodies to *T. pallidum*, such as those present at a very early stage of infection. Therefore, a negative result at any time does not preclude the possibility of exposure to infection with syphilis.

All treponemal test results tend to remain reactive following treponemal infection therefore they should not be used to evaluate response to therapy. Because of the persistence of reactivity, generally for the life of the patient, the treponemal tests are of no value in determining relapse or re-infection in a patient who had a reactive result. In this case, it is recommended to use other assays: Syphilis Total Ab, Syphilis IgM EIA and RPR.

9. PERFORMANCES CHARACTERISTICS

9.1. Precision Study

Precision study was realized by testing 3 samples (1 negative, 1 low positive and 1 positive) in 10 replicates in the same run (repeatability) and in 2 replicates during 5 days on 2 different lots and reading by 2 operators (Intermediate precision).

Repeatability: The 3 samples gave identical results when repeated 10 times.

Intermediate/ inter-lot precision: The 3 samples gave identical results when tested in the different conditions (40 times).

9.2. Clinical performance

The performances of the TPHA assay have been determined by testing samples from random blood donors, hospitalized patients, patients infected with syphilis and on samples positive for markers unrelated to infection by the *T. pallidum*.

The studies were carried out on 2 blood donor sites and at the Bio-Rad site.

9.2.1. Specificity

A total of 5032 samples from blood donors prospectively collected in 2 different sites were studied.

The samples were either serum (3626), EDTA K2 (539) or Lithium Heparin plasma (867) tested in a period of less than 7 days after sampling and were compared to the screening assay used in the laboratory.

Table 1 : Blood donor population

Site	Number	Initial Reactive samples (IR)	Repeated Reactive samples (RR)	Specificity (%)	95% Confidence Interval
Site # 1	2519	18	7	99.72% (2512/ 2519)	99.43% – 99.89%
Site # 2	2513*	20	7	99.72% (2505 / 2512)	99.43% – 99.89%
Total	5032	38 (8 positive, 30 equivocal)	14 (3 positive, 11 equivocal)	99.72% (5017/5031)	99.53% – 99.85%

*: one sample (true positive) was withdrawn from the calculation.

The total specificity on the blood bank population is equal to **99.72% (5017/5031)** with a 95% confidence interval of [99.53% – 99.85%]. Among the 14 false positive samples, 11 were found repeated equivocal.

A retrospective study was also carried out on 201 frozen samples from patients from a Sexually Transmitted Disease Center or from vendors, which were found negative for syphilis.

Specificity on these samples is found at **99.5% (200/201)** with a 95% confidence interval at [97.3%- 100.0%].

9.2.2. Sensitivity

The sensitivity study was studied on 435 retrospective frozen serum samples from the laboratory of Sexually Transmitted Disease Center, or from frozen samples from vendors. These samples were characterized positive by immunoassays, FTA assay, RPR/ VDRL assay or TPHA assays according to their origin.

All the samples were tested first with the CE mark TPHA assay and then with the Bio-Rad TPHA 500 assay (72504).

Sensitivity on this population is found at **100% (435/435)** with a 95% confidence interval at [99.2%-100.0%].

9.3. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity was tested against the WHO International Standard for Syphilis NIBSC code 05/132. Using the semi-quantitative protocol, the sensitivity was found at 0.05 IU/mL.

9.4. Analytical Specificity / Cross Reactivity Study

210 potentially interfering samples containing antibodies against pathogens that could lead to infectious illnesses (Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, VZV, Rubella virus, Hepatitis C virus, Hepatitis B virus, HIV 1/2, HTLV 1/2, *Toxoplasma gondii*, Dengue, Malaria, Leptospirosis), samples from pregnant women and multiparous women or samples from patients with immune system disorders (autoantibodies (SLE), Rheumatoid factors), were tested with the TPHA assay. Four (4) true positive samples were discarded from the calculation.

One sample was found repeatable positive with the TPHA test.

The specificity observed on this target population of 99.5 % (205/206) was similar to the specificity of clinical samples.

9.5. Prozone Effect

The existence of a possible prozone effect was studied by testing 3 samples with high titers ($\geq 1:20480$) at different dilutions. The equivalence of results observed among non-diluted and diluted samples indicates the absence of the prozone effect.

10. BIBLIOGRAPHY REFERENCES

1. Daguet G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995 ; 120 :5-30.
2. Houg H. - Syphilis: new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992; 3 : 391- 413.8.
3. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981 ; 14 : 441 – 445.
4. North MLet Guntz Ph. Serodiagnostics de la syphilis. La Revue Française des Laboratoires, 1997 ; 294 : 51-58.
5. Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. – Treponematoses : aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol. 1991a ; 23 : 88-89.
6. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDT/RES 1965 ; 77 : 65.
7. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5.
8. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973 ; 49 : 242-8.

9. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis: a review. Genitourin Med. 1992 ; 68 : 413-9.
10. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. Clin Chem Lab Med. 2009. 47:596-606.
11. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308, 1966.
12. Tomizawa T. Kasamatsu S. Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969 ; 22 : 341-50.

**Bio-Rad**

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00
Fax: +33 (0)1 47 41 91 33
www.bio-rad.com



2014/12
883683

**Набор реагентов для определения антител к *Treponema pallidum* в
сыворотке и/или плазме крови человека с помощью РПГА
(реакция пассивной гемагглютинации) –**

ТРНА.

Исполнения:

ТРНА - 200 тестов

ТРНА - 500 тестов

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

BIO-RAD

ТРНА

 200
 500

 72503
 72504

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К *TREPONEMA PALLIDUM* В
СЫВОРОТКЕ И/ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ РПГА (РЕАКЦИЯ
ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ)

 **CE**

 883683 - 2014/12

BIO-RAD

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
2. ОБЗОР И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	3
3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	3
4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	4
5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	4
6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	5
7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
8. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	10
10. БИБЛИОГРАФИЯ.....	11

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ТРНА предназначен для качественного и/или полуколичественного определения антител к *Treponema pallidum* в сыворотке и/или плазме крови человека с помощью реакции пассивной гемагглютинации при обследовании доноров и пациентов на наличие сифилитической инфекции.

2. ОБЗОР И ОБЪЯСНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

Сифилис – это хроническое инфекционное заболевание, которое в своем развитии проходит несколько четко различимых стадий: первичный, вторичный, третичный и четвертичный сифилис. На этих стадиях происходит развитие различных клинических симптомов, наиболее характерными из которых являются образование первичных язв, так называемых шанкров, затем – появление сифилитической сыпи, за которым следует продолжительный латентный период без каких-либо видимых клинических проявлений. Инфекция при отсутствии лечения может вызывать нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы и нейросифилис.

Возбудителем данной инфекции является спирохета *Treponema pallidum*. Заражение обычно происходит при половом контакте, однако болезнь может передаваться и при переливании инфицированной крови. Кроме того, возможно развитие внутриутробной инфекции. Было установлено, что данный микроорганизм практически невозможно выращивать на искусственных питательных средах, и диагностика инфекции обычно основывается на выявлении антител в крови, которые появляются вскоре после первоначального заражения и могут персистировать в ней в течение многих лет.

Выделяют четыре категории исследований на наличие сифилиса: прямое микроскопическое исследование, трепонемные антительные тесты, нетрепонемные антительные тесты и прямые антигенные тесты. В связи с наличием продолжительных латентных периодов заболевания и ввиду неспецифической природы антител, выявляемых с помощью нетрепонемных тестов, при проведении скрининговых исследований все чаще используются тесты, основанные на определении специфических анти-трепонемных антител в образцах крови. Одним из таких тестов является ТРНА.

3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В наборах ТРНА использованы стабилизированные птичьи эритроциты, покрытые антигеном *T. pallidum* (штамм Николса), которые связывают специфические антитела, присутствующие в сыворотке или плазме крови пациента. Клетки представлены в виде суспензии в среде, которая содержит компоненты, способные устранять неспецифические реакции.

Положительные реакции характеризуются агглютинацией клеток, отрицательные реакции – осаждением клеток на дне лунки в виде пугонки или маленького кольца.

Несмотря на то, что данные наборы предназначены для проведения, прежде всего, качественного анализа, они могут быть использованы и для определения уровня антител посредством их титрования последовательным двукратным разведением.

Интерпретация картины агглютинации осуществляется на основании результатов визуальной оценки.

4. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

4.1. Описание

Наименование реагента		Описание	Варианты исполнения	
			72503 200 тестов	72504 500 тестов
R1	Сенсибилизированные клетки (Test Cells)	Сенсибилизированные клетки Суспензия птичьих эритроцитов, покрытых антигенами <i>T. pallidum</i> , содержащая бычий сывороточный альбумин (БСА)	7,8 мл/флакон 2 шт	20 мл/флакон 2 шт
R2	Контрольные клетки (Control Cells)	Контрольные клетки Суспензия птичьих эритроцитов, содержащая БСА	7,8 мл/флакон 2 шт	20 мл/флакон 1 шт
R3	Раствор для разведения (Diluent)	Раствор для разведения Солевой раствор, содержащий кроличью сыворотку	20 мл/флакон 2 шт	125 мл/флакон 1 шт
R4	Положительный контрольный образец (Positive Control)	Положительный контрольный образец Человеческая сыворотка, содержащая антитела к <i>T. pallidum</i> , отрицательная по HBs антигену, анти-ВИЧ 1/2 и анти-ВГС антителам, разведенная в фосфатном буферном растворе	1 мл/флакон 1 шт	1 мл/флакон 1 шт
R5	Отрицательный контрольный образец (Negative Control)	Отрицательный контрольный образец Кроличья сыворотка, разведенная в фосфатном буферном растворе	1 мл/флакон 1 шт	1 мл/флакон 1 шт

4.2. Условия хранения и использования

Данный набор должен храниться при температуре +2-8°C. Хранить флаконы в вертикальном положении. Не замораживать.

Каждый компонент набора, хранящийся при температуре +2-8°C, может быть использован до окончания срока годности, указанного на упаковке. После вскрытия флаконов и в отсутствие контаминации реагенты R1, R2, R3, R4 и R5, хранящиеся при +2-8°C, могут быть использованы до окончания срока годности, указанного на этикетке.

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для диагностики *in vitro*. Предназначено для профессионального применения медицинскими работниками.

5.1. Меры по обеспечению безопасности и охраны здоровья:

- Данный набор реагентов предназначен для использования только квалифицированными специалистами, прошедшими специальное обучение в области проведения лабораторных исследований и осведомленными о связанных с ними потенциальных факторах риска. Следует использовать специальную защитную одежду, перчатки и средства для защиты глаз/лица и должным образом соблюдать соответствующие Принципы надлежащей лабораторной практики.

- Набор содержит компоненты, которые изготовлены на основе сыворотки крови человека. Все они прошли исследование на этапе забора крови у доноров и определены как отрицательные по наличию HBs антигена, анти-ВИЧ 1/2 и анти-ВГС антител. Однако методов, способных обеспечить полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, не существует. Поэтому со всеми производными крови человека, реагентами и биологическими образцами, полученными от человека, следует обращаться как с потенциально способными к передаче инфекции, соблюдая универсальные меры безопасности в отношении гемотрансмиссивных патогенов, определенные в местных, региональных и национальных нормативных актах.
- Разлитый биологический материал человеческого происхождения должен быть обработан как потенциально инфицированный.

Если пролитый материал не содержит кислоты, необходимо незамедлительно провести обработку участка пролива, всех материалов, всех загрязненных поверхностей и оборудования соответствующим химическим дезинфицирующим средством, которое является эффективным в отношении потенциальной биологической опасности рассматриваемых образцов (как правило, гипохлорит натрия в разведении 1:10, 70-80 % этиловый или изопропиловый спирт, йодофор, например, 0,5 % Wescodyne Plus и т. д.), а затем вытереть насухо.

Разлитые материалы, содержащие кислоты, необходимо тщательно устранить при помощи впитывающего материала (вытереть) или нейтрализовать, участок разлива промыть водой и вытереть насухо. Сорбирующие материалы, использованные для удаления разлитой жидкости, следует утилизировать согласно требованиям к обращению с биологически опасными отходами. Затем этот участок необходимо обработать одним из химических дезинфицирующих средств.

Примечание: Не помещайте хлорсодержащие растворы в автоклав!

- Все образцы и материалы, использованные для проведения теста, должны быть утилизированы как вещества, потенциально содержащие возбудителей инфекции. Обращение с лабораторными, химическими и биологически опасными отходами, а также их утилизация, должны осуществляться с соблюдением всех местных, региональных и национальных нормативных требований.
- Паспорт безопасности материала представлен на интернет-сайте www.bio-rad.com

5.2. Предупреждения, касающиеся выполнения методики

5.2.1. Подготовка

Достоверность результатов обусловлена точным выполнением следующих правил Надлежащей лабораторной практики:

- При постановке теста не смешивать и не использовать совместно реактивы из различных партий.
- Не использовать реактивы с истекшим сроком годности.
- Перед использованием реактивы необходимо выдержать в течение 30 минут при комнатной температуре (18-30°C) для их стабилизации.

5.2.2. Процедура

- Не вносить изменений в процедуру исследования.
- Использовать новый наконечник для внесения каждой пробы.

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы сыворотки или плазмы (собранной с ЭДТА, цитратом натрия, гепарином или цитратным антикоагулянтом с декстрозой) не должны содержать клеточных элементов крови и не иметь явных признаков загрязнения микроорганизмами. Образцы могут храниться при температуре +2-

8°C в течение 7 дней перед проведением теста. Образцы, требующие более длительного хранения, следует замораживать при -20°C или более низкой температуре.

Перед тестированием замороженные образцы необходимо разморозить и хорошо перемешать. Не следует подвергать образцы процедуре замораживания-оттаивания более 5 раз. Образцы, подвергшиеся нагреванию при температуре 56 °C в течение 3 часов, пригодны для проведения исследования.

Содержание в образце до 100 мг/л билирубина, до 36 г/л триглицеридов и до 10 г/л гемоглобина не влияет на результат. Однако не рекомендуется использовать для исследования сильно гемолизированную сыворотку или плазму, а также сыворотку или плазму с очень высоким содержанием липидов.

Если образцы подлежат транспортировке, их необходимо упаковать в соответствии с действующими правилами транспортировки этиологических агентов, предпочтительно транспортировать в замороженном виде.

7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

ВНИМАНИЕ: Положительный и отрицательный контрольные образцы (R4 и R5), входящие в набор, должны использоваться в каждой постановке теста.

7.1. Необходимые материалы, не входящие в состав набора

- Дистиллированная вода
- Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия
- Фильтровальная бумага
- Одноразовые перчатки
- Защитные очки
- Одноразовые пробирки
- Автоматические или полуавтоматические пипетки с варьируемым или постоянным объемом, либо многоканальные пипетки для отбора и внесения различных объемов жидкости (10 мкл, 25 мкл, 75 мкл и 190 мкл).
- Шейкер для микропланшетов
- Микропланшеты на 96 лунок с U-образным дном
- Контейнер для биологически опасных отходов

7.2. Методика проведения исследования (ручной метод)

7.2.1. Качественный анализ

Для каждого образца необходимо использовать три круглодонные лунки на микропланшете.

Набор ТРНА 500 (Кат№ 72504) предназначен для скринингового исследования значительного количества образцов, но содержит лишь небольшой объем контрольных клеток. Предполагается, что при исследовании образцов в первой постановке должны использоваться только сенсibilизированные клетки, контрольные же клетки следует использовать при повторной постановке теста, которая осуществляется в случае получения положительных результатов первоначального теста.

а. Разведение образцов и контролей (1 к 20)

Внести 190 мкл раствора для разведения (R3) в лунку.

Добавить 10 мкл образца или положительного контрольного образца (R4) или отрицательного контрольного образца (R5) в ту же самую лунку.

Тщательно перемешать.

б. Выполнение теста

Перенести 25 мкл разведенного контрольного образца или разведенного образца из лунки для разведения в лунку для тестирования.

Перенести 25 мкл разведенного контрольного образца или разведенного образца из лунки для разведения в контрольную лунку.

Встряхивая флаконы, ресуспендировать сенсibilизированные клетки (R1) и контрольные клетки (R2). Убедиться, что клетки полностью ресуспендированы.

Внести 75 мкл сенсibilизированных клеток (R1) в лунку для тестирования и 75 мкл контрольных клеток (R2) в контрольную лунку.

Конечное разведение образца составляет 1: 80.

Тщательно перемешать содержимое лунок.

Инкубировать при комнатной температуре (15-30 °C) на поверхности, не подвергающейся воздействию вибрации, в течение минимум 45 минут.

Оценить картину клеточной агглютинации. Эта картина остается неизменной в течение, по меньшей мере, трех часов при условии, что микропланшет находится в состоянии покоя.

7.2.2. Полуколичественный анализ

Для каждого образца необходимо использовать 9 круглодонных лунок на микропланшете: одна лунка для разведения образца или контрольного образца и 8 лунок – для титрования.

Примечание: Положительный и отрицательный контрольные образцы (R4 и R5) должны быть включены в постановку каждой серии тестов с использованием описанной ниже процедуры.

а. Разведение образцов и контрольных образцов (1 к 20)

Внести 190 мкл раствора для разведения (R3) в лунку.

Добавить 10 мкл образца или отрицательного контрольного образца (R5) или положительного контрольного образца (R4) в ту же самую лунку.

Тщательно перемешать.

б. Титрование

Оставить первую лунку пустой, внести по 25 мкл раствора для разведения (R3) в каждую из оставшихся 7 лунок.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 мкл (R3) + 10 мкл Образец или (R4) или (R5)		25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3
Разведения образцов и контрольных образцов	8 лунок для титрования							

Перенести 25 мкл разведенного контроля или образца в первую лунку и во вторую лунку, затем перемешать.

После чего осуществить серийные разведения во всей последовательности лунок, удалив из последней лунки лишние 25 мкл.

		25мкл	25мкл	25мкл	25мкл	25мкл	25мкл		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	
190 мкл (R3) + 10 мкл Образец или (R4) или (R5)	25 мкл разв. контр. образца	25 мкл R3 + 25 мкл разв.. контр. образца	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	25 мкл R3	Удалить лишние 25 мкл
Разведения образцов и контрольных образцов	8 лунок для титрования								

с. Выполнение теста

Аккуратно перемешать сенсibilизированные клетки (R1) для обеспечения полного ресуспендирования.

Добавить 75 мкл сенсibilизированных клеток (R1) в каждую лунку.

Конечное разведение образца после добавления клеток варьирует в диапазоне от 1:80 до 1:10240.

Тщательно перемешать.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
190 мкл (R3) + 10 мкл Образец или (R4) или (R5)	25 мкл разв. контр. образца + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1	25 мкл разв. + 75 мкл R1
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Разведения образцов и контр. образцов	8 лунок для титрования							

Инкубировать при комнатной температуре (15-30°C) на поверхности, не подвергающейся воздействию вибрации, в течение минимум 45 минут.

Оценить картину клеточной агглютинации. Эта картина остается неизменной в течение, по меньшей мере, трех часов при условии, что планшет находится в состоянии покоя.

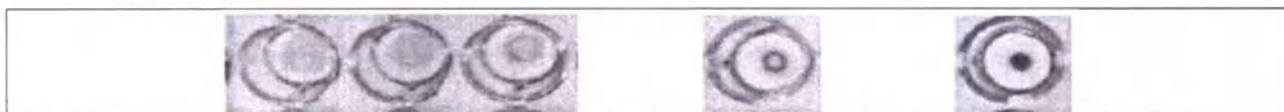
Титром образца следует считать самое большое разведение, при котором происходит агглютинация.

7.3. Контроль качества

Исследование контрольных образцов в составе набора должно давать правильные результаты: отрицательный контрольный образец (R5) – отрицательная реакция, положительный контрольный образец (R4) – положительная.

Когда входящий в состав набора положительный контрольный образец (R4) раститрован, ожидаемое конечное разведение, дающее положительную реакцию, составляет 1:640 - 1:5120.

7.4. Интерпретация результатов и критерии оценки правильности выполнения теста



Положительный

Неопределенный

Отрицательный

Результат	Сенсibilизированные клетки	Контрольные клетки
Положительный: ярко выраженная реакция	Дно лунки покрыто гладким слоем клеток.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Слабо-положительный	Клетки покрывают около 1/3 поверхности дна лунки.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Неопределенный	Клетки сосредоточены ближе к центру в форме круга с широким центром.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Отрицательный	В центре рабочей ячейки формируется плотная пуговка из клеток, как правило, с очень маленьким отверстием в середине.	«Пуговка», соответствующая отрицательному результату
Неспецифическая реакция	Положительная реакция.	Положительная реакция

Если при исследовании образца в лунке с сенсibilизированными клетками не наблюдается реакции, то такой образец считается **отрицательным на наличие *T. pallidum***.

Реактивность меньше той, что указана как «неопределенная», свидетельствует об отрицательном результате теста.

Любой образец, результаты исследования которого можно оценить как неопределенные или положительные, должен рассматриваться как положительный и подвергнуться повторному исследованию в соответствии с описанным выше протоколом, но в двух повторях, при этом в одну серию ячеек необходимо добавить контрольные клетки (R2), а в другую – сенсibilизированные клетки (R1).

Если хотя бы в одной из лунок с сенсibilизированными клетками (R1) результат окажется неопределенным или положительным, образец должен считаться **положительным на наличие *T. pallidum***.

При наличии неспецифической реакции, картина агглютинации должна оцениваться следующим образом: если агглютинация более выражена у сенсibilизированных клеток (R1), чем у контрольных (R2), образец расценивается как положительный и должен быть подвергнут повторному исследованию.

Если же при исследовании такого образца наблюдается более выраженная или сопоставимая агглютинация у контрольных клеток (R2), образец необходимо абсорбировать, следуя нижеописанной методике.

7.5. Абсорбция неспецифических реакций

(Процедура проводится в том случае, когда наблюдается агглютинация и сенсibilизированных, и контрольных клеток).

1. Добавить 10 мкл образца к 190 мкл ресуспендированных контрольных клеток, хорошо перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
2. Центрифугировать до осаждения клеток при минимум 1500g в течение 3 минут.
3. Внести по 25 мкл супернатанта, полученного в ходе выполнения этапа 2, в каждую из двух лунок.
4. Аккуратно перемешать сенсibilизированные и контрольные клетки для обеспечения достаточного ресуспендирования.
Добавить 75 мкл сенсibilизированных клеток в первую лунку.
Добавить 75 мкл контрольных клеток во вторую лунку.
5. Тщательно перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение минимум 45 минут.
6. Оценить и интерпретировать картину клеточной агглютинации, согласно описанной выше схеме.

8. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

Отдельные тесты или точно определенные эталонные стандарты для каждой из стадий заболевания отсутствуют. Поэтому диагностика сифилиса опирается, преимущественно, на серологическое исследование, для чего требуются результаты как нетрепонемных, так и трепонемных тестов.

Ни один из диагностических тестов не может дать абсолютной гарантии, что в образце не содержатся антитела к *T. pallidum* в низкой концентрации, как, может, например, происходить на самой ранней стадии заболевания. Следовательно, отрицательный результат, полученный в какой-либо момент времени, не исключает вероятности заражения сифилисом.

Как правило, результаты всех трепонемных тестов остаются положительными и после проведения терапии трепонемной инфекции, поэтому эти тесты не могут быть использованы для оценки ответа на лечение. Поскольку реактивность сохраняется практически в течение всей жизни пациента, трепонемные тесты не являются достоверным методом выявления рецидива или повторного инфицирования у людей, ранее имевших положительные результаты такого исследования. В данном случае рекомендуется использовать другие методики анализа и соответствующие наборы: Syphilis Total Ab, Syphilis IgM EIA и RPR.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1. Исследование воспроизводимости

Исследование воспроизводимости заключалось в проведении анализа 3 образцов (1 отрицательный, 1 слабоположительный и 1 положительный) в 10 повторах в одной и той же постановке теста (сходимость) и в 2 повторах в течение 5 дней, с применением реактивов из 2 различных партий и с привлечением 2 различных специалистов для оценки результатов (внутрилабораторная воспроизводимость).

Сходимость: при исследовании всех 3 образцов десять раз были получены идентичные результаты.

Внутрилабораторная воспроизводимость/ воспроизводимость между партиями: в ходе анализа всех 3 образцов, проводимого в различных условиях (40 раз), были получены идентичные результаты.

9.2. Клинические характеристики

Характеристики метода ТРНА определялись посредством оценки образцов, полученных у произвольно выбранных доноров крови, госпитализированных пациентов и пациентов, зараженных сифилисом, а также образцов, в которых были выявлены маркеры, не связанные с инфекцией *T. pallidum*.

Исследования проводились в 2 центрах донорской крови, а также в исследовательском центре Bio-Rad.

9.2.1. Специфичность

Всего было исследовано 5032 образца, полученных у доноров в 2 различных центрах в ходе проспективных исследований.

Среди образцов была как сыворотка (3626), так и плазма, собранная с ЭДТА К2 (539) или с литий-гепарином (867). Образцы исследовались в течение менее чем 7 дней, следующих за датой забора крови, и результаты сравнивали с результатами скринингового исследования, проводимого в лаборатории.

Таблица 1: Популяция доноров крови

Центр	Кол-во	Первично реактивные образцы (IR)	Повторно реактивные образцы (RR)	Специфичность (%)	95% Доверительный интервал (%)
Центр № 1	2519	18	7	99,72% (2512/ 2519)	99,43% – 99,89%
Центр № 2	2513*	20	7	99,72% (2505 / 2512)	99,43% – 99,89%
Всего	5032	38 (8 положительных, 30 неопределенных)	14 (3 положительных, 11 неопределенных)	99,72% (5017/5031)	99,53% – 99,85%

*:один образец (истинно положительный) был исключен из подсчета.

Общая специфичность по популяции банков крови, равна **99,72% (5017/5031)**, при этом 95% доверительный интервал составляет [99,53% –99,85%]. Из 14 ложноположительных образцов 11 оказались повторно неопределенными.

Также было проведено ретроспективное исследование 201 замороженного образца, полученного от пациентов с отрицательными результатами по сифилису Центра по изучению инфекций, передающихся половым путем, или частных лабораторий.

Специфичность этих образцов составила **99,5% (200/201)** с 95% доверительным интервалом [97,3%- 100,0%].

9.2.2. Чувствительность

Исследование чувствительности проводилось на 435 ретроспективно собранных и замороженных образцах сыворотки, полученных из лаборатории Центра по изучению инфекций, передающихся половым путем, или на замороженных образцах, полученных из частных лабораторий. Эти образцы были определены как положительные при проведении иммуноанализа, исследования с применением метода флуоресцирующих трепонемных антител, проведении RPR/VDRL-тестов или исследования РПГА, в соответствии с их источником.

Все образцы сначала были исследованы при помощи СЕ сертифицированного набора для постановки РПГА, а затем – при помощи набора ТРНА 500 (72504) производства Bio-Rad.

Чувствительность в этой популяции составила **100% (435/435)** с 95% доверительным интервалом [99,2%-100,0%].

9.3. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность исследовалась в сравнении с установленным ВОЗ международным стандартом «Выявление IgG и IgM в плазме крови при наличии сифилиса», код 05/132 в системе NIBSC (Национальный институт биологических стандартов и контроля). При использовании протокола полуколичественного определения, чувствительность составила 0,05 МЕ/мл.

9.4. Аналитическая специфичность / Исследование перекрестной реактивности

210 образцов с потенциальной интерференцией, содержащих антитела к патогенам, которые могут привести к развитию инфекционного заболевания (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус ветряной оспы, вирус краснухи, вирус гепатита С, вирус гепатита В, ВИЧ 1/2, вирус HTLV 1/2, *Toxoplasma gondii*, возбудители лихорадки Денге, малярии, лептоспироза), образцов, полученных у беременных женщин и многократно рожавших женщин, или образцов, полученных у пациентов с заболеваниями иммунной системы (аутоиммунные антитела (СКВ), ревматоидный фактор), было исследовано при помощи ТРНА. Четыре (4) истинно положительных образца были исключены из подсчета.

Один образец оказался положительным и при повторном проведении исследования РПГА.

Специфичность в данной целевой выборке составила **99,5 % (205/206)**, что сопоставимо со специфичностью на клинических образцах.

9.5. Феномен прозоны (хук-эффект)

Вероятность существования феномена прозоны была исследована посредством тестирования 3 образцов с высокими титрами ($\geq 1:20480$) в различных разведениях. Идентичность результатов, полученных при тестировании неразведенных и разведенных образцов, свидетельствует об отсутствии феномена прозоны.

10. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Daguet G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995; 120:5-30.
2. Houn H. - Syphilis: new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992; 3: 391- 413.8.
3. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981; 14: 441 –445.
4. North MLet Guntz Ph. Serodiagnostic de la syphilis. La Revue Francaise des Laboratoires, 1997; 294: 51-58.
5. Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. – Treponematoses: aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol.1991a; 23: 88-89.
6. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDT/RES 1965; 77: 65.

7. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967; 43: 181-5.
8. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973; 49: 242-8.
9. Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis: a review. Genitourin Med. 1992; 68: 413-9.
10. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. Clin Chem Lab Med. 2009. 47:596-606.
11. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci.Biol. 19, 305-308, 1966.
12. Tomizawa T. Kasamatsu S. Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969; 22: 341-50.

Bio-Rad Био-Рад

3, boulevard Raymond Poincare
92430 Marnes-la-Coquette, France

Тел.: +33 (0)1 47 95 60 00

Факс: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com



2014/12
883683

ПРИЛОЖЕНИЕ

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

Показания к применению медицинского изделия

Качественное и/или полуколичественное определение антител к *Treponema pallidum* в сыворотке и/или плазме крови человека с помощью реакции пассивной гемагглютинации при обследовании доноров и пациентов на наличие сифилитической инфекции.

Противопоказания

При строгом соблюдении инструкции по применению противопоказаний к применению данного медицинского изделия нет.

Побочные действия

Не применимо для данного МИ

Область применения

Только для диагностики *in vitro*.

Условия хранения и использования (Дополнение)

Данный набор должен храниться при температуре +2-8°C (в холодильнике, холодильной камере).

Хранить флаконы в вертикальном положении. Не замораживать.

Каждый компонент набора, хранящийся при температуре +2-8°C, может быть использован до окончания срока годности, указанного на упаковке. После вскрытия флаконов и в отсутствие контаминации реагенты R1, R2, R3, R4 и R5, хранящиеся при +2-8°C, могут быть использованы до окончания срока годности, указанного на этикетке.

Условия транспортирования

Изделие следует перевозить в оригинальной упаковке производителя, защищающей продукцию от внешних воздействий, на всех видах транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Температурный режим: 2-8 °C

При проведении погрузочно-разгрузочных работ и транспортировании следует строго выполнять требования манипуляционных знаков, нанесенных на упаковке и транспортной таре.

При несоблюдении условий транспортирования медицинское изделие не подлежит использованию!

Предупреждения и меры предосторожности (Дополнение)

В состав некоторых реагентов входит азид натрия. Концентрация вещества менее 0,1%.

В директиве № 1272/2008 (CLP - классификация, маркировка и упаковка) не представлены токсикологические данные для смесей, содержащих азид натрия. Следовательно, в соответствии с рекомендациями CLP, оценка острой токсичности рассчитывается из токсичности ингредиентов. При используемых в смесях концентрациях вещества <0,1%, смеси не классифицируются как опасные.

Однако, азид натрия может вступать в химические реакции со свинцом или медью водопроводных труб, образуя чрезвычайно взрывоопасные азиды данных металлов. Для предотвращения накопления азидов, следует смывать удаляемые жидкости большим количеством воды.

Клинические характеристики (Дополнение)

В ходе клинических испытаний (в форме клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия с целью регистрации МИ), проведенных ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», проанализировано 300 образцов клинического материала от 68 женщин и 32 мужчин в возрасте от 10 до 87 лет (от каждого пациента были получены образцы сыворотки и плазмы с различными заявленными антикоагулянтами). 100 образцов сыворотки, 50 образцов плазмы с ЭДТА, 50 образцов плазмы с цитратом натрия, 50 образцов плазмы с гепарином натрия и 50 образцов плазмы с АСД были исследованы для оценки чувствительности и специфичности испытуемого медицинского изделия в сравнительных испытаниях с использованием зарегистрированного в РФ изделия сравнения.

Чувствительность для испытуемого МИ ИВД составила **100%** (доверительный интервал 97,57% - 100%, с доверительной вероятностью 95%), специфичность для испытуемого МИ ИВД составила **100%** (доверительный интервал 97,57% - 100%, с доверительной вероятностью 95%).

По результатам клинических испытаний установлена эффективность, качество и безопасность МИ Набор реагентов для определения антител к *Treponema pallidum* в сыворотке и/или плазме крови человека с помощью РПГА (реакция пассивной гемагглютинации) – ТРНА., производства Bio-Rad (Био-Рад), Франция.

Утилизация

Утилизация изделия должна производиться в соответствии с требованиями локального, регионального и национального законодательства.

Все образцы и материалы, использующиеся и образующиеся при выполнении исследований, в том числе реагенты с истекшим сроком годности, следует утилизировать как потенциально эпидемиологически опасные отходы (класс Б).

Гарантии

Производитель гарантирует соответствие характеристик медицинского изделия заявленным в эксплуатационной документации при условии применения изделия в соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренному производителем.

По всем вопросам, для получения технической консультации и поддержки следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

ООО «Био-Рад Лаборатории»

Адрес: 105064, г. Москва, Нижний Сусальный переулок, дом 5, строение 5А.

Телефон: +7 (495) 721-14-04



Elvire FERNET
Parabody Affairs Manager
Date: June 5, 2019

[Handwritten signature]

Vu pour certification
matérielle de la signature
de M. Elvire FERNET
apposée ci-dessous
PARIS, le 06-06-2019
Cette certification de signature(s) ne peut en aucun cas substituer au présent acte ou au le rattachement de son acte authentique. La responsabilité de l'acte pour lequel il est apposée est laissée en toute liberté à celui ou ceux qui l'ont apposé.



Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Siret : 789 947 322 00010



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1 République française
- Le présent acte public
- 2 a été signé par **Me CHEVAL**
- 3 agissant en qualité de **Notaire**
- 4 est revêtu du sceau timbre de **Son étude**
- Atteste
- 5 à Paris
- 6 le **06 JUIL. 2019**
- 7 par le Procureur général **Michel LERNOUT** *[Signature]* **PREMIER AVOCAT GENERAL**
- 8 sous le **22049-7**
- 9 Sceau

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"

(Гербовая печать)
Кристоф Шеваль, помощник нотариуса
Париж

Сильвия ФЕРНЕЗ
Руководитель по вопросам нормативного регулирования
Дата: 05 июня 2019 г.
(Подпись)

(Штамп)
Био-Рад
бульвар Раймона Пуанкаре, 3
92430, г. Марн-ля-Кокетт – Франция
Siret: 789 947 322 00010

(Штамп)
Свидетельствую верность подписи г-жи Сильвии Фернез, поставленной в г. Париже 11.06.2019.
Свидетельствование верности подписи не подтверждает верность и подлинность подписанного документа. Нотариус не несет ответственности за содержание такого документа.
(Подпись)

(Гербовая печать)
Кристоф Шеваль, помощник нотариуса
Париж

(Гербовая печать)
Апелляционный суд Парижа

АПОСТИЛЬ

(в соответствии с Гаагской Конвенцией от 05 октября 1961 г.)

1. Страна: Французская Республика Для РОССИИ
Настоящий официальный документ
2. Подписан **г-ном ШЕВАЛЕМ**
3. действующим(-ей) в качестве **нотариуса**
4. скреплен печатью/штампом **вышеуказанного нотариуса**

Удостоверено

5. в Париже
6. **10 июля 2019 г.**
7. *Генеральным прокурором апелляционного суда Парижа*
8. за номером **22049-1**
9. Печать/штамп:
10. Подпись:

(Гербовая печать)
Апелляционный суд Парижа

(Подпись)
Мишель Лерну
Первый заместитель генерального
прокурора

Настоящий апостиль удостоверяет только подлинность подписи, печати или штампа, которыми он скреплен. Он не удостоверяет содержание документа и не означает утверждения его содержания Французской Республикой.

Перевод данного текста сделан мной, переводчиком Алексеевым Алексеем Александровичем.

Российская Федерация

Город Москва

Двадцать четвертого июля две тысячи девятнадцатого года

Я, Акимов Глеб Борисович, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Алексеева Алексея Александровича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/09-н/77-2019-

61-1999

Взыскано государственной пошлины(по тарифу): 100 руб.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 200 руб.



Г.Б. Акимов

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 36 лист(а)(ов)

Нотариус



Прошито в количестве 37 листов

«25» июля 2019 года

Директор направления "Клинические исследования"
ООО «ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова

