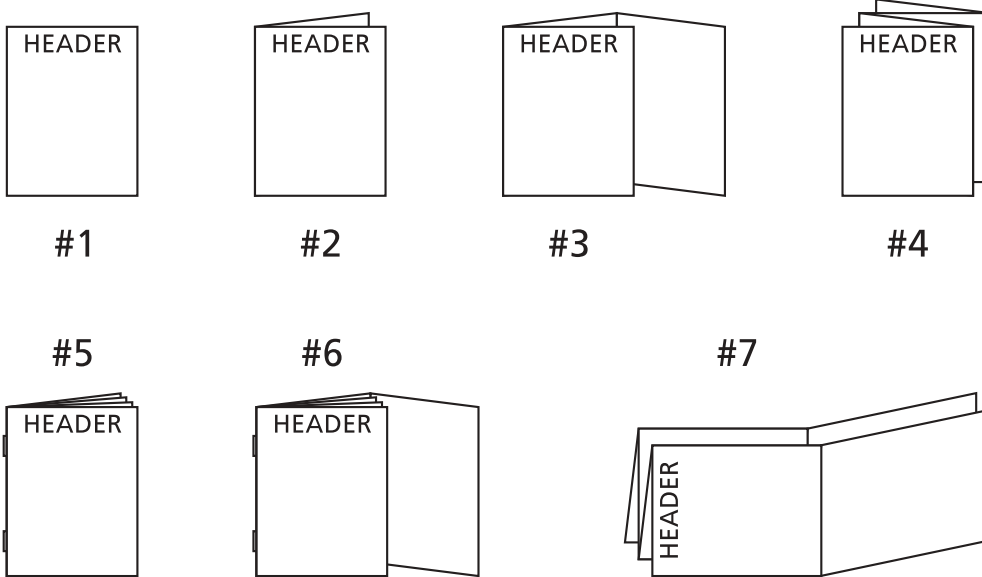



Rev From	Rev To	ECO #	Date	Appr.
1082	0903	1905-03		

Notes

- BD Cat. No. 224051 & 235161
- Blank (Sheet) Size : Length: 14" Width: 21"
 Number of Pages: 12 Number of Sheets: 1
 Page Size: Length 14" Width 3.5" Final Folded Size: 2.33" X 3.5"
- Style (see illustrations below): #4



- See Specification Control No. S1238 for Material Information
- Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 PMS# 2755 (blue)
- Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	 Becton, Dickinson and Company 250 Schilling Circle Cockeysville, MD. 21030-0243 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: S1238		Category and Description Package Insert Difco USR Antigen and Test Control Serum Set	Sheet: 1 of 13 Scale: 1:1	A

BD Difco™ USR Antigen Difco™ USR Test Control Serum Set

CE S1238
2003/09

English: pages 1 - 3 Italiano: pagine 7 - 10
Français: pages 3 - 5 Español: páginas 10 - 12
Deutsch: Seiten 5 - 7

See symbol glossary at end of insert.
Voir le glossaire des symboles à la fin de la notice.
Consulte el glosario de símbolos al final del prospecto.
Vedere il glossario dei simboli alla fine del foglio illustrativo.
Siehe Symbol-Erklärungen am Ende der Packungsbeilage.
Se symbolförteckningen vid slutet av bipacksedeln.
Se symbolglossaret i slutningen af indlægssedlen.
Consulte o glossário de símbolos no fim do folheto informativo.
Δείτε το γλωσσάριο των συμβόλων στο τέλος του ένθετου.

Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner.
Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες.
Contacte o seu representante local da BD para obter instruções.
Kontakt lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar.

INTENDED USE

Difco™ Unheated Serum Reagin (USR) Antigen is recommended for use in the USR test for the detection of reagin, an antibody-like substance, by the qualitative and quantitative slide flocculation tests, as an aid in the diagnosis of syphilis.

The USR Test Control Serum Set is standardized human sera used to control the USR test.

SUMMARY AND EXPLANATION

Treponema pallidum is the causative agent of syphilis. Syphilis is a chronic infection with clinical manifestations that occur in distinct stages. Specific laboratory tests are recommended for the detection of each stage of the disease.

During the primary stage, treponemes present in the characteristic lesion, a chancre, are detectable by dark-field microscopy¹ or by the Direct Fluorescent Antibody Test for *T. pallidum* (DFA-TP). During the secondary stage, most serological tests for syphilis are reactive and treponemes may be found in the lesions by using dark-field microscopy. The latent period, which is asymptomatic, may last for years. Serological tests are usually reactive in the early latent period, but the reactivity of nontreponemal tests decreases during the late latent period. Symptoms of tertiary or late stage syphilis may occur 10-20 years after initial infection. Approximately 71% of patients in the tertiary stage of syphilis have reactive non-treponemal tests.^{2,3} In the tertiary stage, treponemal tests will usually be reactive and are the only basis for diagnosis. The lesions in tertiary syphilis will have few treponemes. Neurosyphilis and late cardiovascular syphilis are complications of tertiary syphilis.

Since the clinical manifestations of syphilis can be confused with other infectious or noninfectious conditions, proper diagnosis must include microscopic examination of lesion material and serological results.²

Difco USR Antigen is a nontreponemal antigen composed of cardiolipin, cholesterol and lecithin. The antigen is a modification of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) Antigen emulsion in a USR suspending solution. The antigen suspension contains choline chloride, which enhances the reactivity of reagin in unheated serum.⁴ The USR Test is suitable for qualitative as well as quantitative determinations.

Nontreponemal tests measure reagin, an antibody-like substance that can be detected in syphilitic serum. Reagin is also occasionally found in the serum of persons with other acute or chronic diseases. Reactive nontreponemal tests aid in the diagnosis of latent subclinical syphilis and are effective tools for detecting cases in epidemiological investigations. Nontreponemal tests are superior to treponemal tests for following the response to therapy.²

Nontreponemal antigen tests are not entirely specific for syphilis, nor do they have satisfactory sensitivity in all stages of syphilis. Whenever the results of a nontreponemal antigen test disagree with the clinical impression, a treponemal antigen test such as the Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption (FTA-ABS)^{2,3} test should be performed. Nontreponemal tests such as the USR, are used to screen patient serum and provide only presumptive evidence for syphilis. Treponemal tests such as the FTA-ABS are used for confirmation.

The likelihood of obtaining a reactive USR test result in various stages of untreated syphilis has been reported as follows:⁵

Stage of Untreated Syphilis	% Reactive
Primary	80
Secondary	100
Latent	95

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

In the USR test procedure, the patient's unheated serum is mixed with a buffered saline suspension of USR Antigen containing cardiolipin, lecithin and cholesterol. The combination of reagin and USR Antigen forms microscopic clumping called flocculation.

REAGENTS

USR Antigen is 0.03% cardiolipin and 0.9% cholesterol dissolved in absolute alcohol with sufficient lecithin (approximately 0.2%) to produce standard reactivity. The antigen is suspended in a solution containing EDTA, choline chloride and phosphate with 0.2% thimerosal as a preservative.^{5,6}

USR Test Control Serum Set contains 3 mL each, of the following lyophilized human sera with 0.02% thimerosal as a preservative:

- Nontreponemal Antigen Reactive Serum
- USR Weakly Reactive Serum
- Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum

These reagents are standardized to provide reactive, weakly reactive and nonreactive readings, respectively, when tested according to the USR test procedure.

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* Diagnostic Use.
2. **WARNING!** POTENTIAL BIOHAZARDOUS REAGENTS. Each donor unit used in preparation of USR Test Control Serum Set was tested by an FDA-licensed method for the presence of the antibody to Human Immunodeficiency Virus (HIV) and for hepatitis B surface antigen (HbsAg) and found negative (were not repeatedly reactive).
3. Because no test method can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent, specimens and control solutions should be handled as though capable of transmitting an infectious disease. "Standard Precautions"⁷⁻¹⁰ and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.
4. **USR Test Control Serum Set**
The Packaging of This Product Contains Dry Natural Rubber.

Storage: Store USR Antigen at 2-8°C. If the original 3 mL quantity exceeds what is needed for one testing period, transfer the remainder from the first day's use to one or more aliquot vials and store at 2-8°C.

Store the lyophilized sera in the USR Test Control Serum Set at 2-8°C. Store the reconstituted control sera at 2-8°C or divide into aliquots sufficient for one day of testing and store at -20°C. Do not thaw and refreeze.

Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.

Product Deterioration: Expiration date applies to product in its intact container when stored as directed. Do not use if the product is caked, discolored or shows other signs of deterioration.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Collect a blood specimen by aseptic venipuncture into a clean, dry tube without anticoagulant. After the specimen has clotted, centrifuge the specimen at 1,500-2,000 rpm for 5 min to obtain test serum. Store serum specimens at room temperature for no longer than 4 h; for prolonged storage, keep at 2-8°C for up to 5 days or maintain below -20°C. Serum specimens must be clear, free of hemolysis and show no visible evidence of bacterial contamination, such as turbidity or particulate matter. Refer to appropriate references for additional information on collection of specimens.^{2,11,12}

PROCEDURE

Materials Provided: Difco USR Antigen, Difco USR Test Control Serum Set.

Materials Required But Not Provided: 0.9% saline, nondisposable glass syringe, 1-2 cc, nondisposable calibrated 18-gauge needles without bevel, micropipettor, 50 µL, pipettes, serological, graduated to tip; 1.0 mL, graduated in 1/100 mL; 5.0 mL, graduated in 1/10 mL; 10.0 mL, graduated in 1/10 mL.

Slides, 2 x 3 inches with paraffin or ceramic rings approximately 14 mm in diameter and high enough to prevent spillage during rotation.

Slide holder for 2 x 3 inch slides

Mechanical rotator, adjustable to 180 ± 2 rpm circumscribing a circle 19 mm in diameter on a horizontal plane.

Light microscope with 10X ocular and 10X objective, sterile purified water, absolute alcohol, acetone, timer, applicator sticks.

Reagent Preparation: Equilibrate all materials to room temperature (23-29°C) before performing the tests. Ensure that all glassware and pipettes are clean and free of detergent residues.

USR Antigen is ready to use.

USR Test Control Serum Set: To reconstitute the control sera, add 3 mL sterile purified water and rotate gently to completely dissolve the contents.

Preparation of Specific Glassware:

Syringes with needles:

1. Prerinse with tap water.
2. Soak and hand wash thoroughly in a glassware detergent solution.
3. Rinse with tap water 6-8 times.
4. Rinse with unused purified water.
5. Rinse with absolute alcohol.
6. Rinse with acetone.
7. Air dry until the acetone odor is completely eliminated.
8. Remove needles from syringes for storage.

Ceramic-ringed slides:

1. Prerinse with tap water.
2. Wash with a glassware detergent solution. Avoid prolonged soaking of ceramic-ringed slides in detergent solution because the ceramic rings will become brittle and flake off.

3. Rinse with tap water 3-4 times.
4. Rinse with unused purified water.
5. Wipe dry with a clean lint-free cloth. If cleaned slides do not allow serum to spread evenly within the inner surface of the circle, proceed as follows.
6. Scrub the slides with a nonscratching cleanser.
7. Rinse, dry and polish with a clean, lint-free cloth.

Testing the Accuracy of the Antigen Suspension Needle

1. The accuracy of the test depends on the amount of antigen suspension used. Check the calibration of the needle periodically to ensure delivery of the correct volume of USR Antigen suspension.
2. For the qualitative and quantitative tests on serum, dispense the antigen suspension from a syringe fitted with an 18-gauge needle without bevel that will deliver 45 ± 1 drops of antigen suspension per mL when held vertically.
3. Place the needle on a 1 mL syringe. Fill the syringe with 0.5 mL of USR Antigen suspension. Holding the syringe in a vertical position, count the number of drops delivered in 0.5 mL. The needle is correctly calibrated if 22-23 drops are delivered in 0.5 mL.
4. Adjust or replace the needle if it does not meet this specification. Repeat calibration on the new or adjusted needle.
5. After each day of use, clean the dispensing needle, bottle and syringe by rinsing with water, alcohol and acetone, in that order. Remove the needle from the syringe after cleaning.

USR Qualitative Slide Test on Serum

For reliable and reproducible test results, the USR Antigen suspension, controls and test specimens must be at 23-29°C when tests are performed.

1. Pipette 50 μ L of unheated serum into one ring of a paraffin- or ceramic-ringed slide using a safety pipetting device. Do not use a glass slide with concavities, wells or glass rings. Spread the serum with a circular motion of the pipette tip so that the serum covers the entire inner surface of the paraffin or ceramic ring.
2. Gently swirl to resuspend the USR Antigen and withdraw the desired quantity with a syringe and needle.
3. Hold the syringe and needle containing the USR Antigen suspension in a vertical position. Dispense several drops to clear the needle of air. Add exactly 1 free-falling drop (22 μ L) of antigen suspension to each circle containing serum. Do not allow the needle to touch the serum.
4. Place the slide on the mechanical rotator. Rotate the slide for 4 min at 180 ± 2 rpm. If the environment is dry, cover the slides with a moist, humidifying cover during rotation to prevent excessive evaporation.
5. Immediately after rotating the slide, remove the slide from the rotator and read the test results microscopically, using a 10X ocular and a 10X objective.

USR Quantitative Test on Serum

1. To quantitate serum samples to an endpoint titer, prepare serum dilutions on the slide at 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8, as follows.
2. Dispense 50 μ L of 0.9% saline in circles 2-4. Do not spread the saline.
3. Dispense 50 μ L of serum in circles 1 and 2.
4. Mix the saline and the serum in circle 2 by drawing the mixture up and down in the pipette approximately 8 times. Mix gently to prevent bubbles.
5. Transfer 50 μ L from circle 2 (1:2) to circle 3 and mix.
6. Transfer 50 μ L from circle 3 (1:4) to circle 4 (1:8), mix, and then discard 50 μ L from circle 4.
7. Spread the contents of each circle to fill the inner surface of the ring using a clean applicator stick for each circle.
8. Holding the syringe and needle containing the USR Antigen suspension in a vertical position, dispense several drops to clear the needle of air. Then, add exactly 1 free-falling drop (22 μ L) of antigen suspension to each circle containing serum. Do not allow the needle to touch the serum.
9. Place the slide on the mechanical rotator. Rotate the slide for 4 min at 180 ± 2 rpm. If the environment is dry, cover the slides with a moist, humidifying cover during rotation to prevent excessive evaporation.
10. Immediately after rotating the slide, remove the slide from the rotator and read the test results microscopically using a 10X ocular and a 10X objective.
11. If the highest dilution tested (1:8) is reactive, prepare a 1:8 dilution of the test specimen by adding 0.1 mL of serum to 0.7 mL of 0.9% saline. Mix thoroughly. Retest as in steps 1-9, above.

User Quality Control

Test antigen suspension reactivity with control sera (Reactive, Weakly Reactive, and Nonreactive). Use the antigen suspension only if it produces the expected reactivity with the control sera (Reactive, Weakly Reactive, and Nonreactive).

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent NCCLS guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

RESULTS

Qualitative Test

1. Read and record results as follows:
 - Medium to large clumps - Reactive (R)
 - Small clumps - Weakly Reactive (WR)
 - No clumping or very slight roughness - Nonreactive (N)
2. Verify that the control sera results are as expected. If reactions are not as expected, the test is invalid and results cannot be reported.
3. Perform a quantitative test on all serum specimens that produce Reactive, Weakly Reactive or "rough" Nonreactive results, since prozone reactions are occasionally encountered.

Quantitative Test

Report the titer as the highest dilution that produces a Reactive result.

Table 1. Sample quantitative USR test result.

If Reactive results are obtained through dilution 1:32, prepare further two-fold serial dilutions in 0.9% saline (1:64, 1:128 and 1:256) and retest using the quantitative test procedure.

Undiluted (1:1)	Serum Dilutions					Report
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	WR	N	N	N	N	Reactive, undiluted
R	R	WR	N	N	N	Reactive, 1:2 dilution
R	R	R	WR	N	N	Reactive, 1:4 dilution
WR	WR	R	R	WR	N	Reactive, 1:8 dilution
N (rough)	WR	R	R	R	N	Reactive, 1:16 dilution
WR	N	N	N	N	N	Weakly Reactive, undiluted

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

If control results are not as expected, patient results should not be reported.

1. The results of the serum USR test must be confirmed by a treponemal test.
2. The diagnosis of syphilis depends on the results of the USR test, treponemal confirmatory test, clinical signs and symptoms, and risk factors.
3. A Reactive USR test may indicate past or present infection with a pathogenic treponeme. However, it may be a false-positive reaction. A false positive is determined if the confirmatory treponemal test is negative.
4. A Nonreactive USR test with clinical evidence of syphilis may indicate early, primary syphilis, a prozone reaction in secondary syphilis, or late syphilis.
5. A Nonreactive USR test with no clinical evidence of syphilis indicates no current infection, an effectively treated infection, or latent syphilis.
6. A quantitative USR test detects changes in reagin titer. Therefore, a serum specimen showing a four-fold increase in titer on a repeat specimen may indicate an infection, a reinfection or a treatment failure. Likewise, a four-fold decrease during treatment indicates adequate syphilis therapy.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Positive results obtained by using USR Antigen should not be considered as conclusive evidence that the patient is syphilitic. Conversely, a nonreactive USR test, by itself, does not rule-out the diagnosis of syphilis.
2. A prozone reaction may occur in which reactivity with true positive undiluted serum is inhibited. The prozone phenomenon often gives Weakly Reactive or "rough" Nonreactive results in the qualitative test. Specimens with such nonreactive results must be quantitatively tested.
3. Biological false-positive reactions can occur with nontreponemal tests in persons who abuse drugs, have diseases such as lupus erythematosus, mononucleosis, malaria, leprosy or viral pneumonia, or who have recently been immunized.¹²
4. Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.
5. If the temperature of the testing area, specimens or reagents is less than 23°C, test reactivity is decreased. If the temperature is greater than 29°C, test reactivity is increased.¹²
6. Test results are unpredictable when testing hemolyzed, contaminated or extremely turbid serum specimens.
7. Test results may be erroneous if speed and time of rotation are not correct.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS^{13,14}

The performance of the USR slide test was compared to a rapid plasma reagin (RPR) card test and the VDRL slide test in a study conducted by Pettit, Larsen, Pope, Perryman and Adams.¹³ Quantitative tests were performed on 664 syphilitic sera from treated and untreated patients in different stages of the disease. Also included were 95 false-positive sera and 36 sera from normal donors. The VDRL slide test and the RPR card test were used as a basis for comparison with the USR test. Results of the USR quantitative tests paralleled the VDRL and RPR tests with approximately 84% agreement.¹³

In a second study by Saxena and Ghosh,¹⁴ the performance of the USR slide test was compared to the standard VDRL slide test and the complement fixation (CF) test. Tests were performed on 476 samples of blood. The results obtained are recorded in the table below and show that the USR test can detect 93% of the syphilitic reactive sera.

Number of sera	USR Test Results	VDRL Test Results	CF Test Results
43	+	+	+
2	-	+	-
1	+	-	-
430	-	-	-

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
224051	Difco™ USR Antigen, 6 x 3 mL
235161	Difco™ USR Test Control Serum Set, 1 set Set contains: Nontreponemal Antigen Reactive Serum, 3 mL USR Weakly Reactive Serum, 3 mL Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum, 3 mL Aliquot Vials, 3 vials

REFERENCES

- Kennedy, E.J. and E.T. Creighton. 1998. Dark field microscopy for the detection and identification of *Treponema pallidum*, p. 119-134. In S.A. Larsen, V. Pope, R.E. Johnson and S.J. Kraus (ed.), Manual of tests for syphilis, 9th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Janda, W.M. (ed.). 1994. Immunology, p. 9.7.1-9.7.20. In H.D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Norris, S.J., V. Pope, R.E. Johnson and S.A. Larsen. 2003. *Treponema* and other human host-associated spirochetes, p. 955-971. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Perine, P.L., A.L. Wallace, J.H. Blount and S.T. Brown. 1981. Syphilis, p. 631-673. In A. Ballows and W.J. Hausler, Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Portnoy, J. and W. Garson. 1960. New and improved antigen suspension for rapid reagin test for syphilis. Public Health Rep. 75:985-988.
- Portnoy, J., H.W. Bossak, V.H. Falcone and A. Harris. 1961. A rapid reagin test with unheated serum and new improved antigen suspension. Public Health Rep. 76:933-935.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53-80.
- U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
- Thomas, R.B. and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover, Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Larsen, S.A., V. Pope, R. E. Johnson and S.J. Kraus. 1998. A manual of tests for syphilis, 9th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Pettit, D.E., S.A. Larsen, V. Pope, M.D. Perryman, and M.R. Adams. 1982. Unheated serum reagin test as a quantitative test for syphilis. J. Clin Microbiol. 15:238-242.
- Saxena, R.S. and B.N. Ghosh. 1969. A comparative study of unheated serum reagin (USR), VDRL and CF tests for syphilis. Ind. Jour. Med. Res. 57:2203-2204.

BD Difco USR Antigen Difco USR Test Control Serum Set

Français

APPLICATION

Le **Difco** Unheated Serum Reagin (USR) Antigen (antigène de réagine sérique non chauffée **Difco**) est recommandé pour réaliser le test USR servant à détecter la réagine, une substance apparentée à un anticorps, par les tests qualitatifs et quantitatifs de floculation sur lame, afin de faciliter le diagnostic de la syphilis.

L'USR Test Control Serum Set (jeu de sérums de contrôle du test USR) est un ensemble de sérums humains standardisés servant de contrôles au test USR.

RESUME ET EXPLICATION

Treponema pallidum est l'agent pathogène de la syphilis. La syphilis est une infection chronique qui évolue en trois phases distinctes. Des tests de dépistage spécifiques sont recommandés à chacun des stades de la maladie.

Au cours de la phase primaire, les tréponèmes présents dans la lésion caractéristique, un chancre, sont détectables par microscopie¹ sur fond noir ou immunofluorescence directe spécifique de *T. pallidum* (DFA-TP). Au cours de la phase secondaire, la plupart des tests sérologiques de dépistage de la syphilis sont sensibles et les tréponèmes peuvent être mis en évidence dans les lésions par microscopie sur fond noir. La phase de latence, asymptomatique, peut durer plusieurs années. Les tests sérologiques sont habituellement sensibles au début de la phase de latence, mais la sensibilité des tests non tréponémiques décroît pendant la phase de latence tardive. Les symptômes de la phase tertiaire ou tardive de la syphilis se manifestent environ 10 à 20 ans après l'infection initiale. Environ 71 % des patients en phase tertiaire de la syphilis réagissent aux tests non tréponémiques.^{2,3} En phase tertiaire, les tests tréponémiques sont habituellement sensibles et constituent la seule base de diagnostic. Les lésions associées à la syphilis en phase tertiaire comportent peu de tréponèmes. La neurosyphilis et la syphilis cardio-vasculaire tardive sont des complications de la syphilis en phase tertiaire.

Comme les manifestations cliniques de la syphilis peuvent être confondues avec d'autres états infectieux ou non infectieux, le diagnostic doit comprendre l'examen microscopique de biopsies de lésions et les résultats des tests sérologiques.²

Le **Difco** USR Antigen est un antigène non tréponémique composé de cardioline, cholestérol et lécithine. Cet antigène est une version modifiée de l'émulsion d'antigène VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) dans une solution suspensive USR. La suspension d'antigène contient du chlorure de choline, qui accroît la réactivité de la réagine dans le sérum non chauffé.⁴ Le test USR est adapté aux analyses qualitatives et quantitatives.

Les tests non tréponémiques dosent la réagine, une substance apparentée à un anticorps qui peut être détectée dans le sérum syphilitique. La réagine se retrouve aussi parfois dans le sérum de patients atteints d'autres maladies aiguës ou chroniques. Les tests non tréponémiques sensibles facilitent le diagnostic de la syphilis infraclinique latente et constituent des outils de dépistage efficaces lors d'études épidémiologiques. Les tests non tréponémiques sont supérieurs aux tests tréponémiques pour le suivi de la réponse au traitement.²

Les tests d'antigène non tréponémique ne sont pas totalement spécifiques de la syphilis et ne présentent pas une sensibilité satisfaisante à tous les stades de la syphilis. Lorsque les résultats d'un test d'antigène non tréponémique ne concordent pas avec le tableau clinique, un test d'antigène tréponémique, comme le test FTA-Abs d'immunofluorescence absorbée du tréponème,^{2,3} doit être effectué. Les tests non tréponémiques comme l'USR servent uniquement de tests de dépistage présomptifs de la syphilis à partir d'échantillons sériques. Des tests tréponémiques comme le FTA-Abs doivent être effectués à titre de confirmation. La probabilité d'obtenir un résultat de test USR positif (sérum réactif) aux différents stades d'une syphilis non traitée est la suivante :³

Stade de la syphilis non traitée	Positivité (%)
Primaire	80
Secondaire	100
Latente	95

PRINCIPES DE LA METHODE

Pour réaliser le test USR, le sérum non chauffé du patient est mélangé à une suspension d'USR Antigen dans du sérum physiologique tamponné contenant de la cardioline, de la lécithine et du cholestérol. L'USR Antigen conjugué à la réagine forme des agrégats microscopiques, que l'on nomme floculation.

REACTIFS

L'USR Antigen est composé de 0,03 % de cardioline et de 0,9 % de cholestérol dissous dans de l'alcool absolu avec une quantité suffisante de lécithine (environ 0,2 %) pour présenter une réactivité standard. L'antigène est en suspension dans une solution contenant de l'EDTA, du phosphate et du chlorure de choline avec 0,2 % de thimérosal (conservateur).^{5,6} L'USR Test Control Serum Set contient 3 mL de chacun des sérums humains lyophilisés suivants avec 0,02 % de thimérosal (conservateur) :

- Nontreponemal Antigen Reactive Serum
- USR Weakly Reactive Serum
- Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum

Ces sérums sont standardisés pour être réactif, faiblement réactif et non réactif, respectivement, lorsqu'ils sont testés conformément au mode opératoire du test USR.

Avvertissements et précautions

- Réserve au diagnostic *in vitro*.
- AVERTISSEMENT : REACTIFS A RISQUE BIOLOGIQUE.** Chaque unité de donneur utilisée pour la préparation de l'USR Test Control Serum Set a été testée par des méthodes sous licence FDA de dépistage d'anticorps spécifiques du virus d'immunodéficience humaine (VIH) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) et s'est avérée négative (n'était pas réactive à plusieurs reprises).
- Aucune méthode de test ne pouvant garantir avec certitude l'absence du VIH, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux, il convient de manipuler les échantillons et les contrôles comme des produits capables de transmettre une maladie infectieuse. Respecter les "Précautions standard"⁷⁻¹⁰ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.
- USR Test Control Serum Set**
L'emballage de ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Conservation : Conserver l'USR Antigen à une température comprise entre 2 et 8 °C. Si le volume de réactif nécessaire pour réaliser une série de tests est inférieur à 3 mL, aliquoter le reste de la solution utilisée le premier jour et conserver les aliquotes entre 2 et 8 °C.

Conserver les sérums lyophilisés dans l'USR Test Control Serum Set entre 2 et 8 °C. Conserver les sérums de contrôle reconstitués entre 2 et 8 °C ou aliquoter en quantités suffisantes pour une journée de test et conserver à -20 °C. Ne pas recongeler une fois décongelé.

L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.

Détérioration du produit : La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions. Ne pas utiliser le produit s'il présente un aspect agglutiné ou décoloré, ou d'autres signes de détérioration.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Recueillir un échantillon sanguin par ponction veineuse en conditions aseptiques dans un tube propre et ne contenant pas d'anticoagulant. Une fois l'échantillon coagulé, centrifuger à 1 500 à 2 000 tr/min pendant 5 min pour séparer le sérum à tester. Conserver les échantillons sériques à température ambiante pendant 4 h maximum ; pour un stockage prolongé, conserver entre 2 et 8 °C jusqu'à 5 jours ou congeler à -20 °C. Les échantillons sériques doivent être limpides, non hémolysés et dépourvus de traces de contamination bactérienne (échantillon turbide ou matières particulaires visibles). Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur le prélèvement des échantillons.^{2,11,12}

METHODE

Matériaux fournis : Difco USR Antigen, Difco USR Test Control Serum Set.

Matériaux requis mais non fournis : Sérum physiologique (0,9 %), seringue de verre lavable de 1 à 2 mL, aiguilles étalonnées 18 G lavables à pointe non biseautée, micropipette de 50 µL, pipettes sérologiques graduées jusqu'à l'extrémité : 1,0 mL par incrément de 0,01 mL, 5,0 mL par incrément de 0,1 mL et 10,0 mL par incrément de 0,1 mL.

Lames de 5,08 x 7,62 cm environ avec anneaux de paraffine ou de céramique de 14 mm de diamètre environ et de hauteur suffisante pour empêcher un débordement en cours de rotation. Porte-lames pour lames de 5,08 x 7,62 cm

Agitateur rotatif réglable à 180 ± 2 tr/min, décrivant un cercle de 19 mm de diamètre dans le plan horizontal.

Microscope optique équipé d'un oculaire 10X et d'un objectif 10X, eau purifiée stérile, alcool absolu, acétone, minuterie et écouvillons.

Préparation du réactif : Laisser le matériel s'équilibrer jusqu'à la température ambiante (23 à 29 °C) avant d'effectuer les tests. S'assurer que la verrerie et les pipettes utilisées sont propres et exemptes de traces de détergent.

L'USR Antigen est prêt à l'emploi.

USR Test Control Serum Set : Pour reconstituer les sérums de contrôle, ajouter 3 mL d'eau purifiée stérile et agiter doucement avec un mouvement de rotation pour dissoudre entièrement le contenu.

Préparation de la verrerie spécifique :

Seringues avec aiguilles :

1. Rincer à l'eau courante.
2. Faire tremper la verrerie dans une solution détergente et laver soigneusement à la main.
3. Rincer 6 à 8 fois à l'eau courante.
4. Rincer à l'eau purifiée non usagée.
5. Rincer à l'alcool absolu.
6. Rincer à l'acétone.
7. Sécher à l'air jusqu'à disparition de l'odeur d'acétone.
8. Retirer les aiguilles des seringues avant de les ranger.

Lames à anneaux de céramique :

1. Rincer à l'eau courante.
2. Laver avec une solution détergente adaptée à la verrerie. Éviter un trempage prolongé des lames à anneaux de céramique dans une solution détergente car les anneaux de céramique risquent de se fragiliser et de s'effriter.
3. Rincer 3 à 4 fois à l'eau courante.
4. Rincer à l'eau purifiée non usagée.
5. Sécher avec un chiffon non pelucheux propre. Si le sérum ne s'étale pas uniformément sur la surface intérieure de l'anneau des lames nettoyées, procéder comme suit.
6. Frotter les lames avec un nettoyant non récurant.
7. Rincer, sécher et lustrer avec un chiffon non pelucheux propre.

Test de la précision de l'aiguille distributrice de suspension d'antigène

1. La précision du test dépend de la quantité de suspension d'antigène utilisée. Contrôler périodiquement l'étalonnage de l'aiguille pour s'assurer que le volume de suspension d'USR Antigen distribué est conforme.
2. Pour effectuer des tests qualitatifs et quantitatifs sur le sérum, distribuer la suspension d'antigène avec une seringue munie d'une aiguille 18 G à pointe non biseautée pouvant distribuer 45 ± 1 gouttes de suspension d'antigène par mL en position verticale.
3. Monter l'aiguille sur une seringue de 1 mL. Remplir la seringue avec 0,5 mL de suspension d'USR Antigen. En tenant la seringue verticalement, compter le nombre de gouttes distribuées à partir de 0,5 mL. L'aiguille est étalonnée correctement 0,5 mL permettent de distribuer 22 à 23 gouttes.
4. Dans le cas contraire, régler ou remplacer l'aiguille. Etalonner l'aiguille neuve ou remplacée.
5. A la fin de la journée, nettoyer l'aiguille distributrice, le flacon et la seringue à l'eau, puis à l'alcool et l'acétone, dans cet ordre. Retirer l'aiguille de la seringue après nettoyage.

Test USR sur lame qualitatif sur le sérum

Pour obtenir des résultats de test fiables et reproductibles, la suspension d'USR Antigen, les contrôles et les échantillons à tester doivent se trouver à 23 à 29 °C au moment des tests.

1. Déposer 50 µL de sérum non chauffé sur une lame à anneau de paraffine ou de céramique à l'aide d'un pipetteur étalonné. Ne pas utiliser de lame de verre présentant des concavités, puits ou anneaux de verre. Étaler le sérum d'un mouvement circulaire de l'extrémité de la pipette de sorte que le sérum couvre en totalité la surface interne de l'anneau de paraffine ou de céramique.
2. Faire tourner doucement pour remettre en suspension l'USR Antigen et prélever le volume souhaité avec une seringue munie d'une aiguille.
3. Tenir verticalement la seringue munie d'une aiguille contenant la suspension d'USR Antigen. Distribuer plusieurs gouttes pour purger l'aiguille de l'air. Ajouter exactement 1 goutte entièrement formée (22 µL) de suspension d'antigène à chaque cercle rempli de sérum. Ne pas toucher le sérum avec l'aiguille.
4. Placer la lame sur l'agitateur rotatif mécanique. Faire tourner la lame pendant 4 min à 180 ± 2 tr/min. Si l'air ambiant est sec, couvrir les lames d'un couvercle d'humidification humide pendant la rotation pour éviter une évaporation excessive.
5. Sortir la lame de l'agitateur rotatif dès la fin de l'agitation et lire les résultats du test au microscope optique avec un oculaire 10X et un objectif 10X.

Test USR quantitatif sur le sérum

1. Pour doser des échantillons sériques par détermination du point de fin de titrage, préparer des dilutions sériques sur la lame au 1/1, 1/2, 1/4 et 1/8, comme suit.
2. Distribuer 50 µL de sérum physiologique à 0,9 % dans les cercles 2 à 4. Ne pas étaler le sérum physiologique.
3. Distribuer 50 µL de sérum dans les cercles 1 et 2.
4. Mélanger le sérum physiologique et le sérum dans le cercle 2 par aspiration et déposer à la pipette 8 fois de suite environ. Mélanger doucement pour éviter la formation de bulles.
5. Transférer 50 µL du cercle 2 (1/2) dans le cercle 3 et mélanger.
6. Transférer 50 µL du cercle 3 (1/4) dans le cercle 4 (1/8), mélanger, puis éliminer 50 µL du cercle 4.
7. En changeant d'écouvillon à chaque cercle, étaler le contenu du cercle afin de couvrir la surface interne de l'anneau.
8. Tenir à la verticale la seringue munie d'une aiguille contenant la suspension d'USR Antigen et distribuer plusieurs gouttes pour purger l'aiguille de l'air. Puis, ajouter exactement 1 goutte entièrement formée (22 µL) de suspension d'antigène à chaque cercle rempli de sérum. Ne pas toucher le sérum avec l'aiguille.
9. Placer la lame sur l'agitateur rotatif mécanique. Faire tourner la lame pendant 4 min à 180 ± 2 tr/min. Si l'air ambiant est sec, couvrir les lames d'un couvercle d'humidification humide pendant la rotation pour éviter une évaporation excessive.
10. Sortir la lame de l'agitateur rotatif dès la fin de l'agitation et lire les résultats du test au microscope optique avec un oculaire 10X et un objectif 10X.
11. Si la dilution la plus élevée testée (1/8) est réactive, préparer une dilution au 1/8 de l'échantillon testé en ajoutant 0,1 mL de sérum à 0,7 mL de sérum physiologique à 0,9 %. Bien mélanger. Tester de nouveau en répétant les étapes 1 à 9 ci-dessus.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Tester la réactivité de la suspension d'antigène avec les sérums de contrôle (réactif, faiblement réactif et non réactif). N'utiliser la suspension d'antigène que si la réactivité attendue pour les sérums de contrôle (réactif, faiblement réactif et non réactif) est conforme.

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives NCCLS et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

Analyse qualitative

1. Lire et reporter les résultats comme suit :
Agrégats de taille moyenne à grande - Réactif (R)
Agrégats de petite taille - Faiblement réactif (FR)
Absence d'agrégats ou très légères impuretés - Non réactif (N)
2. S'assurer que les sérums de contrôle donnent les résultats attendus. Si les réactions ne sont pas conformes, le test n'est pas valide et les résultats ne doivent pas être pris en compte.
3. Effectuer un test quantitatif sur tous les échantillons sériques réactifs, faiblement réactifs ou non réactifs « estimés », car un effet prozone est parfois observé.

Analyses quantitatives :

Rapporter le titre comme la dilution la plus élevée donnant un résultat de test positif (sérum réactif).

Tableau 1. Résultat de test USR quantitatif sur l'échantillon.

Si la dilution au 1/32 est réactive, diluer plus encore par dilution sériée au demi avec du sérum physiologique à 0,9 % (1/64, 1/128 et 1/256) et tester de nouveau selon la méthode d'analyse quantitative.

Non dilué (1:1)	Dilutions sériques					Rapport
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	FR	N	N	N	N	Réactif, non dilué
R	R	FR	N	N	N	Reactive, dilution au 1:2
R	R	R	FR	N	N	Reactive, dilution au 1:4
FR	FR	R	R	FR	N	Reactive, dilution au 1:8
N (estimé)	FR	R	R	R	N	Reactive, dilution au 1:16
FR	N	N	N	N	N	Faiblement réactif, non dilué

INTERPRETATION DES RESULTATS

Si les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, les résultats obtenus sur les échantillons cliniques ne doivent pas être pris en considération.

1. Les résultats du test USR sur le sérum doivent être confirmés par un test tréponémique.
2. Le diagnostic de syphilis dépend des résultats du test USR, du test de confirmation tréponémique, des signes et des symptômes cliniques, ainsi que des facteurs de risque.
3. Un test USR positif (sérum réactif) peut indiquer une infection passée ou présente par un tréponème pathogène. Cependant, il peut s'agir d'un faux positif. Un faux positif est révélé par un test de confirmation tréponémique négatif.
4. Un test USR négatif (sérum non réactif) associé à un tableau clinique de syphilis peut indiquer une syphilis primaire précoce, un effet prozone d'une syphilis en phase secondaire, ou une syphilis tardive.
5. Un test USR négatif (sérum non réactif) sans tableau clinique évocateur de syphilis indique une absence d'infection, une infection traitée avec succès ou une syphilis latente.
6. Un test USR quantitatif détecte les variations de titre de réagine. Par conséquent, un titre sérique multiplié par quatre peut indiquer une infection, une réinfection ou l'échec d'un traitement. De même, un titre sérique divisé par quatre en cours de traitement indique un traitement adéquat de la syphilis.

LIMITES DE LA PROCEDURE

1. Un résultat positif obtenu avec l'USR Antigen ne doit pas être interprété comme un diagnostic de syphilis. Inversement, un test USR négatif (sérum non réactif) ne permet pas à lui seul d'écartier un diagnostic de syphilis.
2. Un effet prozone peut expliquer la non réactivité d'un sérum non dilué positif vrai. L'effet prozone aboutit souvent à des résultats faiblement positifs (sérum faiblement réactif) ou négatifs (sérum non réactif " estimés "). Les échantillons qui présentent de tels résultats négatifs (sérum non réactif) doivent être analysés quantitativement.
3. Des faux positifs peuvent être obtenus avec des tests non tréponémiques chez les toxicomanes et en cas de lupus érythémateux, mononucléose, malaria, lèpre ou pneumonie virale, ou chez les individus récemment vaccinés.¹²
4. L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.
5. La sensibilité du test décroît si la température de la zone de test, des échantillons ou des réactifs est inférieure à 23 °C. Si la température est supérieure à 29 °C, la sensibilité du test est accrue.¹²
6. Les résultats du test sont imprévisibles avec des échantillons hémolysés, contaminés ou présentant une turbidité très importante.
7. Les résultats de tests peuvent être erronés si la vitesse ou la durée de rotation ne sont pas conformes.

CHARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES^{13,14}

Les performances du test USR sur lame ont été comparées à celles du test à la réagine plasmatique rapide (RPR) sur carte et du test VDRL sur lame dans une étude menée par Pettit, Larsen, Pope, Perryman et Adams.¹³ Des analyses quantitatives ont été réalisées sur 664 sérums syphilitiques provenant de patients traités et non traités à différents stades de la maladie. L'étude portait également sur 95 sérums faux positifs et 36 sérums provenant de donneurs sains. Le test VDRL sur lame et le test RPR sur carte ont servi de base de comparaison avec le test USR. Les résultats obtenus avec les tests USR quantitatifs étaient similaires à ceux des tests VDRL et RPR avec environ 84 % de concordance.¹³

Dans une seconde étude menée par Saxena et Ghosh,¹⁴ les performances du test USR sur lame ont été comparées à celles du test VDRL standard sur lame et du test de fixation du complément (CF). Les tests ont été effectués sur 476 échantillons sanguins. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau ci-dessous et montrent que le test USR détecte 93 % des sérums réactifs syphilitiques.

Quantités de sérums	Résultats du test USR	Résultats du test VDRL	Résultats du test CF
43	+	+	+
2	-	+	-
1	+	-	-
430	-	-	-

CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
224051	Difco USR Antigen, 6 x 3 mL
235161	Difco USR Test Control Serum Set, 1 jeu Le jeu contient : Sérum réactif à l'antigène non tréponémique, 3 mL Sérum faiblement réactif à l'antigène USR, 3 mL Sérum non réactif à l'antigène non tréponémique, 3 mL Flacons pour aliquoter, 3 flacons

REFERENCES : Voir la section « References » dans la notice en anglais.

BD Difco USR Antigen **Difco USR Test Control** **Serum Set**

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das **Difco USR Antigen** für Reagentests mit nicht wärmebehandeltem Serum Reagin (Unheated Serum Reagin = USR) wird empfohlen zur Verwendung beim USR-Test zum Nachweis von Reagin (einer antikörperähnlichen Substanz) mittels qualitativer und quantitativer Objektträger-Flockungstests sowie als Hilfsmittel für die Diagnostizierung von Syphilis. Der USR Test Control Serum Set (USR-Test-Kontrollserumsatz) besteht aus standardisierten Humanseren, die als Kontrollen für den USR-Test herangezogen werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Treponema pallidum ist der Erreger von Syphilis. Syphilis ist eine chronische Infektionskrankheit mit klinischen Manifestationen, die in verschiedenen Stadien auftreten. Für den Nachweis der Erkrankung in den einzelnen Stadien werden spezifische Labortests empfohlen.

Während des Primärstadiums liegen Treponemen in der charakteristischen Läsion, dem Schanker, vor und sind mittels mikroskopischer¹ Dunkelfelduntersuchung oder direktem Fluoreszenz-Antikörper-Test auf *T. pallidum* (DFA-TP-Test) nachweisbar. Im Verlauf des Sekundärstadiums sind die meisten serologischen Tests auf Syphilis reaktiv, und Treponemen sind mittels mikroskopischer Dunkelfelduntersuchung in den Läsionen nachweisbar. Die asymptomatische Latenzphase kann Jahre anhalten. Serologische Tests sind in der frühen Latenzphase gewöhnlich reaktiv, jedoch nimmt die Reaktivität von Nicht-Treponema-Tests im Verlauf der späten Latenzphase ab. Symptome des Tertiärstadiums, der sogenannten Spätsyphilis, können 10 - 20 Jahre nach der Erstinfektion auftreten. Circa 71 % der Patienten im Tertiärstadium der Syphilis zeigen reaktive Nicht-Treponema-Tests.^{2,3} Im Tertiärstadium sind Treponema-Tests gewöhnlich reaktiv und die einzige Basis für eine Diagnose. Die Läsionen im Syphilis-Tertiärstadium enthalten nur wenige Treponemen. Neurosyphilis und kardiovaskuläre Spätsyphilis sind Komplikationen des Syphilis-Tertiärstadiums.

Da die klinischen Manifestationen von Syphilis mit anderen infektiösen oder nicht infektiösen Zuständen verwechselt werden können, muss eine korrekte Diagnose die mikroskopische Untersuchung von Läsionsmaterial sowie serologische Ergebnisse einschließen.²

Difco USR Antigen ist ein Nicht-Treponema-Antigen und besteht aus Cardioliipin, Cholesterin und Lecithin. Das Antigen ist eine Modifizierung der VDRL-Antigen-Emulsion des Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) in einer USR-Suspensionslösung. Die Antigensuspension enthält Cholinchlorid zur Förderung der Reaktivität des Reagins im nicht wärmebehandelten Serum.⁴ Der USR-Test eignet sich sowohl für qualitative als auch für quantitative Bestimmungen.

Nicht-Treponema-Tests dienen zur Bestimmung von Reagin, einer in syphilitischem Serum nachweisbaren antikörperähnlichen Substanz. Reagin ist mitunter auch im Serum von Personen mit anderen akuten oder chronischen Erkrankungen nachweisbar. Reaktive Nicht-Treponema-Tests unterstützen die Diagnose von latenter subklinischer Syphilis und sind wirksame Hilfsmittel zum Fallnachweis im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen. Im Hinblick auf die Beobachtung des Ansprechens der Therapie sind Nicht-Treponema-Tests den Treponema-Tests überlegen.²

Nicht-Treponema-Antigentests sind nicht vollkommen syphilis-spezifisch und zeigen auch nicht in allen Stadien der Syphilis eine zufriedenstellende Empfindlichkeit. Wenn die Ergebnisse eines Nicht-Treponema-Antigentests nicht mit dem klinischen Erscheinungsbild übereinstimmen, ist ein Treponema-Antigentest, wie bspw. der Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptionstest (FTA-ABS-Test)^{2,3} durchzuführen. Nicht-Treponema-Tests, wie der USR-Test, dienen zum Screening von Patientenserum und erbringen nur einen präsumtiven Syphilis-Nachweis. Treponema-Tests, wie der FTA-ABS-Test dienen zur Bestätigung.

Die Wahrscheinlichkeit eines reaktiven USR-Testergebnisses in den verschiedenen Stadien einer unbehandelten Syphilis wird folgendermaßen angegeben:³

Stadium der unbehandelten Syphilis	Reaktiv (%)
Primär	80
Sekundär	100
Latenzphase	95

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Beim USR-Test wird nicht wärmebehandeltes Patientenserum mit einer gepufferten USR-Antigen-Kochsalzlösungssuspension vermischt, die Cardiolipin, Lecithin und Cholesterin enthält. Beim Kombinieren von Reagin und USR-Antigen bilden sich mikroskopische Klümpchen, was als Flockenbildung bezeichnet wird.

REAGENZIEN

USR Antigen besteht aus 0,03 % Cardiolipin und 0,9 % Cholesterin, in absolutem Alkohol gelöst, mit einer ausreichenden Menge Lecithin (ca. 0,2 %) zur Erzielung einer standardmäßigen Reaktivität. Das Antigen wird in einer Lösung suspendiert, die EDTA, Cholinchlorid und Phosphat mit 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel enthält.^{5,6}

USR Test Control Serum Set enthält je 3 mL der folgenden lyophilisierten Humansenen mit 0,02 % Thimerosal als Konservierungsmittel:

- Nontreponemal Antigen Reactive Serum
- USR Weakly Reactive Serum
- Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum

Diese Reagenzien sind standardisiert, um beim Testen mit dem USR-Testverfahren reaktive, schwach reaktive bzw. nicht reaktive Bestimmungsergebnisse zu erbringen.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. *In-vitro*-Diagnostikum.
2. **WARNUNG! POTENZIELL BIOGEFÄHRLICHE REAGENZIEN.** Alle zur Herstellung des USR Test Control Serum Set herangezogenen Spendereinheiten wurden mit einer von der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA zugelassenen Methode auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das HI-Virus (HIV) und das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HbsAg) getestet und für negativ befunden (nicht wiederholt reaktiv).
3. Da keines der gegenwärtig bekannten Testverfahren das Vorhandensein von HIV, Hepatitis B und anderen infektiöser Erreger vollständig ausschließen kann, sollten Proben und Kontrolllösungen als potenziell infektiös gehandhabt werden. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die "Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"⁷⁻¹⁰ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.
4. **USR Test Control Serum Set**
Die Verpackung dieses Produkts enthält Naturkautschuk (getrocknet).

Aufbewahrung: USR Antigen bei 2 - 8 °C lagern. Sollte die ursprüngliche Menge von 3 mL den Bedarf für einen Testzeitraum übersteigen, die Reste vom ersten Anwendungstag in ein oder mehrere Aufbewahrungsröhrchen transferieren und bei 2 - 8 °C lagern.

Die lyophilisierten Seren des USR Test Control Serum Set bei 2 - 8 °C lagern. Die rekonstituierten Kontrollseren bei 2 - 8 °C lagern oder in ausreichende Aliquote für einen Testtag aufteilen und bei -20 °C lagern. Nach dem Auftauen nicht erneut einfrieren.

Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.

Halbbarkeit des Produkts: Das Verfallsdatum gilt für das im unversehrten Behälter aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften. Zusammenlebendes, verfärbtes oder sonstige Verfallsanzeichen aufweisendes Produkt nicht verwenden.

PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Mittels aseptischer Venenpunktion eine Blutprobe in ein sauberes, trockenes Röhrchen ohne Antikoagulant entnehmen. Die Probe nach ihrer Gerinnung 5 min lang bei 1500 - 2000 U/min zentrifugieren, um Serum für die Testdurchführung zu gewinnen. Serumproben maximal 4 h lang bei Raumtemperatur aufbewahren. Eine längere Lagerung ist bei 2 - 8 °C möglich (bis zu 5 Tage) bzw. bei Temperaturen unterhalb -20 °C. Serumproben müssen klar und hämolysefrei sein und dürfen keine sichtbaren Anzeichen von Bakterienkontamination, wie Trübung oder Partikel, aufweisen. Zusätzliche Informationen zur Probenentnahme sind der einschlägigen Literatur zu entnehmen.^{2,11,12}

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Difco USR Antigen, Difco USR Test Control Serum Set.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: 0,9%ige Kochsalzlösung, wiederverwendbare Glasspritze (1 - 2 mL), wiederverwendbare kalibrierte 18-G-Kanülen ohne Anströmung, Mikropipette (50 µL), bis zur Spitze skalierte Serologiepipetten (1,0 mL mit 1/100-mL-Skalierung; 5,0 mL mit 1/10-mL-Skalierung; 10,0 mL mit 1/10-mL-Skalierung).

Objektträger (5,08 x 7,62 cm) mit Paraffin- oder Keramikringen von ca. 14 mm Durchmesser und ausreichender Höhe zur Verhütung von Flüssigkeitsaustritt während des Rotierens.

Objekthalter für Objektträger von 5,08 x 7,62 cm.

Auf 180 ± 2 U/min einstellbarer mechanischer Rotationsarm, der einen horizontalen Kreis von 19 mm Durchmesser beschreibt.

Lichtmikroskop mit 10X-Okular und 10X-Objektiv, steriles destilliertes Wasser, absoluter Alkohol, Azeton, Zeitgeber, Applikatorstäbchen.

Vorbereitung der Reagenzien: Vor der Testdurchführung alle Materialien Raumtemperatur (23 - 29 °C) erreichen lassen. Sicherstellen, dass alle gläsernen Utensilien und Pipetten sauber sind und keine Reinigungsmittelrückstände aufweisen.

USR Antigen ist gebrauchsfertig.

USR Test Control Serum Set: Zum Rekonstituieren der Kontrollseren 3 mL steriles, destilliertes Wasser zugeben und behutsam rotieren, bis der Inhalt vollständig gelöst ist.

Vorbereitung spezifischer Glasutensilien:

Spritzen mit Kanülen:

1. Mit Leitungswasser vorspülen.
2. In einer Reinigungslösung für Glasutensilien einweichen und von Hand gründlich waschen.
3. Mit Leitungswasser 6 - 8 Mal spülen.
4. Mit frischem destilliertem Wasser spülen.
5. Mit absolutem Alkohol spülen.
6. Mit Azeton spülen.
7. An der Luft trocknen lassen, bis der Azetongeruch vollständig verschwunden ist.
8. Vor dem Verwenden die Kanülen von den Spritzen entfernen.

Objektträger mit Keramikringen:

1. Mit Leitungswasser vorspülen.
2. Mit einer Reinigungslösung für Glasutensilien waschen. Objektträger mit Keramikringen nicht längere Zeit in der Reinigungslösung einweichen, da dies zum Brüchigwerden und Absplittern der Keramikringe führt.
3. Mit Leitungswasser 3 - 4 Mal spülen.
4. Mit frischem destilliertem Wasser spülen.
5. Mit einem sauberen fusselfreien Tuch abtrocknen. Lässt sich das Serum auf gereinigten Objektträgern nicht gleichmäßig im Inneren des Kreises verteilen, folgendermaßen vorgehen.
6. Die Objektträger mit einem nicht scheuernden Reinigungsmittel schrubben.
7. Abspülen und mit einem sauberen fusselfreien Tuch abtrocknen und polieren.

Genauigkeitsprüfung für die Antigensuspensionskanüle

1. Die Genauigkeit des Tests ist abhängig von der verwendeten Menge Antigensuspension. Die Kalibrierung der Kanüle ist in regelmäßigen Abständen zu überprüfen, um sicherzustellen, dass das korrekte Volumen an USR Antigen-Suspension abgegeben wird.
2. Für qualitative und quantitative Serumtests die Antigensuspension aus einer Spritze mit 18-G-Kanüle ohne Anströmung abgeben, die 45 ± 1 Tropfen Antigensuspension pro mL dispensiert, wenn sie senkrecht gehalten wird.
3. Die Kanüle an einer 1-mL-Spritze montieren. Die Spritze mit 0,5 mL USR Antigen-Suspension füllen. Die Spritze senkrecht halten und die Anzahl der abgegebenen Tropfen in 0,5 mL zählen. Die Kanüle ist dann korrekt kalibriert, wenn 0,5 mL in 22 - 23 Tropfen abgegeben werden.
4. Die Kanüle einstellen oder ersetzen, falls diese Spezifikation nicht eingehalten wird. Die Kalibrierung für die neue bzw. eingestellte Kanüle wiederholen.
5. Nach jedem Anwendungstag die Dispensierkanüle, Flasche und Spritze reinigen; dazu Wasser, Alkohol und Azeton verwenden (in dieser Reihenfolge). Die Kanüle nach der Reinigung von der Spritze entfernen.

Qualitativer USR-Objektträger-Serumtest

Zur Erzielung zuverlässiger und reproduzierbarer Testergebnisse müssen die USR Antigen-Suspension, Kontrollen und Testproben bei der Testdurchführung eine Temperatur von 23 - 29 °C aufweisen.

1. Unter Zuhilfenahme einer Sicherheitspipette 50 µL nicht wärmebehandeltes Serum in einen Ring eines Objektträgers mit Paraffin- oder Keramikringen pipettieren. Keine gläsernen Objektträger mit Kavitäten, Vertiefungen, oder Glasringen verwenden. Das Serum mit einer kreisförmigen Bewegung der Pipettenspitze verteilen, so dass das Serum die gesamte Innenfläche des Paraffin- oder Keramikrings bedeckt.
2. Behutsam schwenken, um das USR Antigen wieder zu suspendieren, und die gewünschte Menge mit Hilfe einer Spritze und Kanüle aufnehmen.
3. Die Spritze und Kanüle mit der USR Antigen-Suspension senkrecht halten. Mehrere Tropfen abgeben, um die Luft aus der Kanüle zu entfernen. Exakt 1 frei fallenden Tropfen (22 µL) Antigensuspension in jeden Kreis mit Serum hinzugeben. Die Kanüle darf das Serum nicht berühren.
4. Den Objektträger auf dem mechanischen Rotationsarm platzieren. Den Objektträger 4 min lang bei 180 ± 2 U/min rotieren lassen. Bei trockenen Umgebungsbedingungen die Objektträger während des Rotierens mit einer feuchten und feuchtigkeitsspendenden Abdeckung versehen, um übermäßiges Verdunsten zu vermeiden.
5. Den Objektträger unmittelbar nach dem Rotieren vom Rotationsarm nehmen, und die Testergebnisse unter Verwendung eines 10X-Okulars und eines 10X-Objektivs mikroskopisch ablesen.

Quantitativer USR-Serumtest

1. Zur quantitativen Bestimmung eines Endtiters für Serumproben auf dem Objektträger Serumverdünnungen von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 herstellen, wie im Folgenden beschrieben.
2. In die Kreise 2 - 4 50 µL 0,9%ige Kochsalzlösung abgeben. Die Kochsalzlösung nicht verteilen.
3. In die Kreise 1 und 2 50 µL Serum abgeben.
4. Die Kochsalzlösung und das Serum in Kreis Nr. 2 vermischen; dazu das Gemisch ca. 8 Mal mit der Pipette aufnehmen und wieder abgeben. Behutsam mischen, um Blasenbildung zu vermeiden.
5. Aus Kreis 2 (1:2) 50 µL in Kreis 3 transferieren und mischen.
6. Aus Kreis 3 (1:4) 50 µL in Kreis 4 (1:8) transferieren, vermischen, und anschließend 50 µL aus Kreis 4 verwerfen.

- Den Inhalt jedes Kreises verteilen, so dass die Innenfläche des Rings bedeckt ist. Für jeden Kreis ein sauberes Applikatorstäbchen verwenden.
- Die Spritze und Kanüle mit der USR Antigen-Suspension senkrecht halten und mehrere Tropfen abgeben, um die Luft aus der Kanüle zu entfernen. Anschließend exakt 1 frei fallenden Tropfen (22 µL) Antigen suspension in jeden Kreis mit Serum hinzugeben. Die Kanüle darf das Serum nicht berühren.
- Den Objektträger auf dem mechanischen Rotationsarm platzieren. Den Objektträger 4 min lang bei 180 ± 2 U/min rotieren lassen. Bei trockenen Umgebungsbedingungen die Objektträger während des Rotierens mit einer feuchten und feuchtigkeitsspendenden Abdeckung versehen, um übermäßiges Verdunsten zu vermeiden.
- Den Objektträger unmittelbar nach dem Rotieren vom Rotationsarm nehmen, und die Testergebnisse unter Verwendung eines 10X-Okulars und eines 10X-Objektivs mikroskopisch ablesen.
- Ist die stärkste getestete Verdünnung (1:8) reaktiv, eine 1:8-Verdünnung der Testprobe herstellen; dazu 0,1 mL Serum zu 0,7 mL 0,9%iger Kochsalzlösung geben. Gut durchmischen. Erneut testen, wie in den vorhergehenden Schritten 1 - 9 beschrieben.

Qualitätssicherung durch den Anwender

Die Reaktivität der Antigen suspension mit Kontrollseren prüfen (reaktiv, schwach reaktiv und nicht reaktiv). Die Antigen suspension nur dann verwenden, wenn sie die erwartete Reaktivität mit den Kontrollseren zeigt (reaktiv, schwach reaktiv und nicht reaktiv).

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die Laborinterne Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten NCCLS-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

ERGEBNISSE

Qualitatives Testverfahren

- Die Ergebnisse werden folgendermaßen abgelesen und dokumentiert:
Mittelgroße bis große Klümpchen - reaktiv (R)
Kleine Klümpchen - schwach reaktiv (SR)
Keine Klümpchen oder sehr geringfügig grobe Beschaffenheit - nicht reaktiv (N)
- Sicherstellen, dass die Kontrollserenergebnisse erwartungsgemäß ausfallen. Fallen die Reaktionen nicht erwartungsgemäß aus, ist der Test ungültig und die Ergebnisse sind nicht berichtbar.
- Für alle Serumproben mit den Ergebnissen „reaktiv“, „schwach reaktiv“ oder „grob“ (nicht reaktiv) einen quantitativen Test durchführen, da es mitunter zu Prozone reaktionen kommt.

Quantitatives Testverfahren

Den Titer als die höchste Verdünnung berichten, die ein reaktives Ergebnis ergibt.

Tabelle 1. Beispiel eines quantitativen USR-Testergebnisses.

Ergibt die 1:32-Verdünnung reaktive Ergebnisse, weitere zweifache Reihenverdünnungen in 0,9%iger Kochsalzlösung herstellen (1:64, 1:128 und 1:256) und unter Anwendung des quantitativen Testverfahrens erneut testen.

Unverdünnung (1:1)	Serumverdünnungen					Bericht
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	SR	N	N	N	N	Reaktiv, unverdünnt
R	R	SR	N	N	N	Reaktiv, 1:2-Verdünnung
R	R	R	SR	N	N	Reaktiv, 1:4-Verdünnung
SR	SR	R	R	SR	N	Reaktiv, 1:8-Verdünnung
N (grob)	SR	R	R	R	N	Reaktiv, 1:16-Verdünnung
SR	N	N	N	N	N	Schwach reaktiv, unverdünnt

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Falls die Kontrollergebnisse nicht erwartungsgemäß ausfallen, sollten die Patientenergebnisse nicht berichtet werden.

- Die Ergebnisse des USR-Serumtests sind mittels eines Treponema-Tests zu bestätigen.
- Die Diagnostizierung von Syphilis ist abhängig von den Ergebnissen des USR-Tests und eines Treponema-Bestätigungstests, klinischen Anzeichen und Symptomen und Risikofaktoren.
- Ein reaktiver USR-Test kann auf eine frühere oder aktuelle Infektion mit einem Treponem- Erreger hindeuten. Es kann sich jedoch auch um eine falsch positive Reaktion handeln. Von einem falsch positiven Ergebnis ist dann auszugehen, wenn der Treponema-Bestätigungstest negativ ausfällt.
- Ein nicht reaktiver USR-Test bei klinischen Anzeichen von Syphilis kann eine Frühsyphilis im Primärstadium anzeigen, eine Prozone reaktion im Syphilis-Sekundärstadium oder eine Spätsyphilis.
- Ein nicht reaktiver USR-Test ohne klinische Anzeichen von Syphilis bedeutet, dass keine aktuelle Infektion, eine wirksam behandelte Infektion oder latente Syphilis vorliegt.
- Ein quantitativer USR-Test dient zur Feststellung von Reagin-Titerveränderungen. Daher kann eine Serumprobe, welche bei Wiederholungsproben einen vierfachen Titeranstieg zeigt, auf eine Infektion, eine erneute Infektion oder ein Fehlschlagen der Therapie hindeuten. Desgleichen deutet eine vierfache Abnahme im Verlauf der Therapie auf die Angemessenheit der Syphilis-Therapie hin.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- Positive Ergebnisse beim USR Antigen-Test sind nicht als eindeutiger Nachweis einer Syphilis-Erkrankung des Patienten zu verstehen. Umgekehrt schließt ein nicht reaktiver USR-Test allein eine Syphilis-Diagnose nicht aus.
- Es kann zu einer Prozone reaktion kommen, bei der die Reaktivität eines tatsächlich positiven unverdünnten Serums gehemmt ist. Das Prozonephänomen führt beim qualitativen Testverfahren häufig zum Ergebnis "schwach reaktiv" oder "grob". Proben mit derartigen nicht reaktiven Ergebnissen sind quantitativ zu bestimmen.
- Zu falsch positiven biologischen Reaktionen kann es kommen, wenn Nicht-Treponema-Tests bei Personen durchgeführt werden, die Drogen missbrauchen, an Erkrankungen wie Lupus erythematoses, Mononukleose, Malaria, Lepra oder Viruspneumonie leiden oder unlängst geimpft wurden.¹²
- Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.
- Beträgt die Temperatur von Testbereich, Proben oder Reagenzien weniger als 23 °C, ist die Testreaktivität reduziert. Liegt die Temperatur über 29 °C, ist die Testreaktivität erhöht.¹²
- Werden hämolytische, kontaminierte oder extrem getrübe Serumproben getestet, sind die Ergebnisse unvorhersehbar.
- Die Testergebnisse können fehlerhaft sein, wenn Drehzahl und Rotationsdauer nicht korrekt sind.

LEISTUNGSMERKMALE^{13,14}

Im Rahmen einer Studie von Pettit, Larsen, Pope, Perryman und Adams wurde die Leistung des USR-Objektträger tests mit der eines RPR-Kartentests (RPR = Rapid Plasma Reagin) und des VDRL-Objektträger tests verglichen.¹³ Es wurden quantitative Tests an 664 syphilitischen Seren therapiert und nicht therapiert Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien durchgeführt. Außerdem wurden 95 falsch positive Seren und 36 Seren von normalen Spendern mitgetestet. Der VDRL-Objektträger test und der RPR-Kartentest dienten als Grundlage für den Vergleich mit dem USR-Test. Die Ergebnisse der quantitativen USR-Tests glichen bei einer Übereinstimmung von ca. 84 % denen der VDRL- und RPR-Tests.¹³

Bei einer zweiten Studie von Saxena und Ghosh¹⁴ wurde die Leistung des USR-Objektträger tests mit der des standardmäßigen VDRL-Objektträger tests und der des Complementbindungstests (CF-Test) verglichen. Die Tests wurden anhand von 476 Blutproben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt und zeigen, dass der USR-Test 93 % der syphilitischen reaktiven Seren nachweisen kann.

Anzahl von Seren	USR-Testergebnisses	VDRL-Testergebnisses	CF-Testergebnisses
43	+	+	+
2	-	+	-
1	+	-	-
430	-	-	-

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
224051	Difco USR Antigen, 6 x 3 mL
235161	Difco USR Test Control Serum Set, 1 Satz Der Satz enthält: Auf Nicht-Treponema-Antigen reaktives Serum, 3 mL Auf USR schwach reaktives Serum, 3 mL Auf Nicht-Treponema-Antigen nicht reaktives Serum, 3 mL Aliquot-Fläschchen, 3 Fläschchen

LITERATUR: Siehe den Abschnitt „References“ im englischen Text.

BD Difco USR Antigen Difco USR Test Control Serum Set

Italiano

USO PREVISTO

L'uso di Difco Unheated Serum Reagin (USR) Antigen (antigene reaginico su siero non riscaldato) è raccomandato per la rilevazione della reagina, una sostanza anticorpo-simile, mediante test - qualitativi e quantitativi - di flocculazione su vetrino, come ausilio nella diagnosi di sifilide.

Il set USR Test Control Serum contiene sieri umani standardizzati usati per controllare il test USR.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Treponema pallidum è l'agente eziologico della sifilide, una infezione cronica con manifestazioni cliniche che si verificano in stadi distinti. Per la rilevazione di ogni stadio della malattia, si raccomandano test di laboratorio specifici.

Durante lo stadio primario, i treponemi presenti nella caratteristica lesione - il sifiloma - vengono rilevati mediante microscopia¹ in campo scuro oppure per mezzo del test anticorpale in fluorescenza diretta per *T. pallidum* (DFA-TP). Durante lo stadio secondario, la maggior parte dei test sierologici per la sifilide risulta reattiva e i treponemi possono essere rinvenuti nelle lesioni mediante microscopia in campo scuro. Il periodo latente, che è asintomatico, può durare anni. I test sierologici sono di norma reattivi nel periodo latente precoce, ma la reattività dei test non treponemici diminuisce nel corso del periodo latente tardivo. I sintomi della sifilide di stadio terziario o tardivo possono manifestarsi 10-20 anni dopo l'infezione iniziale. Circa il 71% dei pazienti nello stadio terziario della sifilide presenta test non treponemici reattivi.^{2,3} Nello stadio terziario, i test treponemici sono solitamente reattivi e rappresentano l'unica base di diagnosi. Le lesioni nella sifilide terziaria presentano pochi treponemi. Neurosifilide e sifilide cardiovascolare tardiva sono complicanze della sifilide terziaria.

Poiché le manifestazioni cliniche di (della) sifilide possono essere confuse con altre condizioni infettive o non infettive, una diagnosi appropriata deve includere l'esame microscopico del materiale delle lesioni e i risultati sierologici.²

Difco **USR Antigen** è un antigene non treponemico costituito da cardioliipina, colesterolo e lecitina. L'antigene è una modificazione dell'emulsione di antigene VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) in una soluzione di sospensione USR. La sospensione antigenica contiene cloruro di colina, che migliora la reattività della reagina nel siero non riscaldato.⁴ Il test USR è adatto a determinazioni qualitative e quantitative.

I test non treponemici misurano la reagina, una sostanza anticorpo-simile rilevabile nel siero sifilitico. La reagina si riscontra occasionalmente anche nel siero di soggetti con altre malattie acute o croniche. I test non treponemici reattivi supportano la diagnosi di sifilide subclinica latente e sono strumenti efficaci per la rilevazione dei casi in ricerche epidemiologiche. I test non treponemici sono superiori ai treponemici ai fini del controllo della risposta alla terapia.²

I test antigenici non treponemici non sono del tutto specifici per la sifilide e non hanno una sensibilità soddisfacente in tutti gli stadi di (della) sifilide. Qualora i risultati di un test antigenico non treponemico non concordino con la valutazione clinica, eseguire un test antigenico treponemico, come per esempio Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption (FTA-ABS).^{2,3} I test non treponemici, come per esempio USR, sono usati per lo screening del siero dei pazienti e forniscono soltanto un'indicazione presuntiva di (della) sifilide. I test treponemici, come per esempio FTA-ABS, sono usati a scopo di conferma.

La probabilità di ottenere un risultato reattivo per il test USR in vari stadi di (della) sifilide non trattata è stata descritta come segue.³

Stadio di sifilide non trattata	% reattività
Primario	80
Secondario	100
Latente	95

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Nella procedura di test USR, il siero non riscaldato del paziente viene miscelato in una sospensione di soluzione fisiologica tamponata di antigene USR contenente cardioliipina, lecitina e colesterolo. La combinazione di reagina e antigene USR determina un'agglutinazione microscopica definita flocculazione.

REAGENTI

USR Antigen contiene cardioliipina allo 0,03% e colesterolo allo 0,9% dissolti in alcol assoluto con lecitina sufficiente (circa 0,2%) a produrre una reattività standard. L'antigene è sospeso in una soluzione contenente EDTA, cloruro di colina e fosfato con timerosal allo 0,2% come conservante.^{5,6}

USR Test Control Serum Set contiene 3 mL di ciascuno dei seguenti sieri umani liofilizzati, con timerosal allo 0,02% come conservante:

- Nontreponemal Antigen Reactive Serum
- USR Weakly Reactive Serum
- Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum

Questi sieri sono standardizzati per fornire letture rispettivamente reattive, debolmente reattive e non reattive, allorché testati in conformità alla procedura di test USR.

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. **AVVERTENZA! REAGENTI A POTENZIALE RISCHIO BIOLOGICO.** Ogni unità di donatore usata nella preparazione del set USR Test Control Serum è risultata negativa (non ripetutamente reattiva) ai test - condotti con una metodica approvata dalla FDA - per la determinazione degli anticorpi anti HIV (virus dell'immunodeficienza umana) e dell'HbSAg (antigene di superficie dell'epatite B).
3. Poiché nessuna metodica di test può garantire con certezza l'assenza di HIV, virus dell'epatite B o altri agenti infettivi, manipolare i campioni e le soluzioni di controllo come materiale potenzialmente infetto. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁷⁻¹⁰
4. **USR Test Control Serum Set**
La confezione di questo prodotto contiene gomma naturale secca.

Conservazione - Conservare USR Antigen a 2 - 8°C. Se la quantità originaria di 3 mL supera quella necessaria per un periodo di test, trasferire il residuo dell'utilizzo del primo giorno in uno o più flaconi di aliquota e conservare a 2 - 8°C.

Conservare i sieri liofilizzati nel set USR Test Control Serum a 2 - 8°C. Conservare i sieri di controllo ricostituiti a 2 - 8°C o suddividerli in aliquote sufficienti per un giorno di test e conservare a -20°C. Non scongelare e ricongelare.

L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.

Deterioramento del prodotto - La data di scadenza si riferisce al prodotto in confezione integra e conservato come prescritto. Non usare il prodotto se appare indurito, scolorito o presenta altri segni di deterioramento.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

In una provetta pulita e asciutta, non contenente anticoagulanti, raccogliere un campione sanguigno mediante venipuntura in asepsi. Una volta formatosi il coagulo, centrifugare il campione a 1.500 - 2.000 giri/min per 5 min per ottenere il siero per il test. Conservare i campioni di siero a temperatura ambiente per non più di 4 h; in caso di conservazione prolungata, conservare a 2 - 8°C per un massimo di 5 giorni oppure tenere a -20°C. I campioni di siero devono essere trasparenti, privi di emolisi e non presentare segni evidenti di contaminazione batterica, come per esempio torbidità o particolati. Per ulteriori informazioni sulla raccolta dei campioni, consultare la documentazione appropriata.^{2,11,12}

PROCEDURA

Materiali forniti - Difco USR Antigen, Difco USR Test Control Serum Set.

Materiali necessari ma non forniti - soluzione fisiologica allo 0,9%, siringa di vetro riutilizzabile da 1-2 cc, aghi 18G riutilizzabili senza smusso, micropipetta da 50 µL, pipette sierologiche, così graduate: da 1,0 mL, graduate in 1/100 mL; da 5,0 mL, graduate in 1/10 mL; da 10,0 mL, graduate in 1/10 mL.

Vetrini da 5,08 x 7,62 cm, con anelli in paraffina o ceramica, del diametro di circa 14 mm e di altezza sufficiente a evitare versamenti durante la rotazione.

Portavetrini per vetrini da 5,08 x 7,62 cm.

Rotatore meccanico, regolabile su 180 ± 2 giri/min, in grado di circoscrivere un cerchio di 19 mm di diametro sul piano orizzontale.

Microscopio ottico con oculare 10X e obiettivo 10X, acqua sterile purificata, alcol assoluto, acetone, cronometro, bastoncini applicatori.

Preparazione dei reagenti - Prima di eseguire i test, lasciare equilibrare tutti i materiali a temperatura ambiente (23 - 29 °C). Assicurarsi che tutta la vetreria e le pipette siano pulite e prive di residui di detersivi.

USR Antigen è pronto per l'uso.

USR Test Control Serum Set - Per ricostituire i sieri di controllo, dispensare 3 mL di acqua sterile purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto.

Preparazione della vetreria specifica

Siringhe con aghi

1. Prerisciacquare con acqua corrente.
2. Immergere e lavare a mano accuratamente in una soluzione detergente per vetreria.
3. Risciacquare con acqua corrente 6 - 8 volte.
4. Risciacquare con acqua purificata non precedentemente utilizzata.
5. Risciacquare con alcol assoluto.
6. Risciacquare con acetone.
7. Lasciare asciugare all'aria fino all'eliminazione completa dell'odore di acetone.
8. Per la conservazione, rimuovere gli aghi dalle siringhe.

Vetrini con anelli di ceramica

1. Prerisciacquare con acqua corrente.
2. Lavare con una soluzione detergente per vetreria. Evitare l'immersione prolungata di vetrini con anelli in ceramica nella soluzione detergente perché gli anelli potrebbero diventare fragili e sfaldarsi.
3. Risciacquare con acqua corrente 3 - 4 volte.
4. Risciacquare con acqua purificata non precedentemente utilizzata.
5. Asciugare con un panno pulito che non lasci residui. Se i vetrini puliti non consentono una diffusione uniforme del siero entro la superficie interna del cerchio, procedere nel modo seguente.
6. Strofinare i vetrini con un detergente anti-graffio.
7. Risciacquare, asciugare e lucidare con un panno pulito che non lasci residui.

Test dell'accuratezza dell'ago della sospensione di antigene

1. L'accuratezza del test dipende dalla quantità di sospensione di antigene usata. Verificare periodicamente la calibrazione dell'ago per garantire la dispensazione del volume corretto di sospensione USR Antigen.
2. Per i test qualitativi e quantitativi su siero, dispensare la sospensione di antigene da una siringa con ago 18G senza smusso, in grado di erogare 45 ± 1 gocce di sospensione di antigene per mL, allorché tenuta in posizione verticale.
3. Montare l'ago su una siringa da 1 mL. Riempire la siringa con 0,5 mL di sospensione USR Antigen. Tenendo la siringa in posizione verticale, contare il numero di gocce dispensate in 0,5 mL. L'ago è correttamente calibrato se in 0,5 mL vengono dispensate 22 - 23 gocce.
4. Regolare o sostituire l'ago se non soddisfa questo prerequisito. Ripetere la calibrazione dell'ago nuovo o regolato.
5. Dopo ogni giorno di utilizzo, pulire l'ago di dispensazione, il flacone e la siringa risciacquando con acqua, alcol e acetone, in tale ordine. Rimuovere l'ago dalla siringa dopo ogni pulizia.

Test qualitativo USR su vetrino su siero

Per ottenere risultati affidabili e riproducibili, al momento di eseguire i test la sospensione USR Antigen, i controlli e i campioni da testare devono essere a 23 - 29 °C.

- Usando un dispositivo di pipettamento di sicurezza, pipettare 50 µL di siero non riscaldato in un anello di un vetrino con anelli in paraffina o ceramica. Non usare un vetrino di vetro con aree concave, pozzetti o anelli di vetro. Distribuire il siero con un movimento circolare del puntale della pipetta in maniera tale che il siero copra l'intera superficie interna dell'anello di paraffina o ceramica.
- Rotare delicatamente per risospendere l'antigene USR e prelevare la quantità desiderata con una siringa e un ago.
- Tenere la siringa e l'ago contenente l'antigene USR in posizione verticale. Dispensare alcune gocce per eliminare l'aria dall'ago. Lasciare cadere liberamente 1 goccia (22 µL) di sospensione di antigene su ogni cerchio contenente siero. Evitare che l'ago venga a contatto con il siero.
- Porre il vetrino sul rotatore meccanico. Fare ruotare il vetrino per 4 min a 180 ± 2 giri/min. Se l'ambiente è secco, coprire il vetrino con un coperchio umidificatore durante la rotazione per evitare un'eccessiva evaporazione.
- Subito dopo la rotazione, rimuovere il vetrino dal rotatore e leggere i risultati del test al microscopio, usando un oculare 10X e un obiettivo 10X.

Test quantitativo USR su siero

- Per quantificare i campioni di siero con un titolo endpoint, preparare sul vetrino diluizioni 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, nel modo seguente.
- Dispensare 50 µL di soluzione fisiologica allo 0,9% nei cerchi 2-4. Non distribuire la soluzione fisiologica.
- Dispensare 50 µL di siero nei cerchi 1 e 2.
- Mescolare la soluzione fisiologica e il siero nel cerchio 2 aspirando e versando la miscela con la pipetta circa 8 volte. Mescolare delicatamente per evitare la formazione di bolle.
- Trasferire 50 µL dal cerchio 2 (1:2) al cerchio 3 e mescolare.
- Trasferire 50 µL dal cerchio 3 (1:4) al cerchio 4 (1:8), mescolare e quindi eliminare 50 µL dal cerchio 4.
- Distribuire il contenuto di ogni cerchio per riempire l'intera superficie dell'anello, usando un bastoncino applicatore pulito per ogni cerchio.
- Tenendo la siringa e l'ago contenente la sospensione di USR Antigen in posizione verticale, dispensare alcune gocce per eliminare l'aria dall'ago. Lasciare quindi cadere liberamente 1 goccia (22 µL) di sospensione di antigene su ogni cerchio contenente siero. Evitare che l'ago venga a contatto con il siero.
- Porre il vetrino sul rotatore meccanico. Fare ruotare il vetrino per 4 min a 180 ± 2 giri/min. Se l'ambiente è secco, coprire il vetrino con un coperchio umidificatore durante la rotazione per evitare un'eccessiva evaporazione.
- Subito dopo la rotazione, rimuovere il vetrino dal rotatore e leggere i risultati del test al microscopio, usando un oculare 10X e un obiettivo 10X.
- Se la diluizione più elevata testata (1:8) è reattiva, preparare una diluizione 1:8 del campione da testare dispensando 0,1 mL di siero in 0,7 mL di soluzione fisiologica allo 0,9%. Mescolare accuratamente. Ripetere i punti 1 - 9 sopra illustrati.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Testare la reattività della sospensione di antigene con i sieri di controllo (reattivo, debolmente reattivo e non reattivo). Usare la sospensione di antigene soltanto se sviluppa la reattività attesa con i sieri di controllo (reattivo, debolmente reattivo e non reattivo).

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione NCCLS in merito.

RISULTATI**Test qualitativo**

- Leggere e annotare i risultati come segue.
Grumi medio - grandi - Reattivo (R)
Grumi piccoli - Debolmente reattivo (DR)
Assenza di grumi o leggerissima disomogeneità - Non reattivo (N)
- Verificare che i risultati dei sieri di controllo siano quelli attesi. Se le reazioni non sono quelle attese, il test non è valido e i risultati non possono essere refertati.
- Eeguire un test quantitativo su tutti i campioni di siero che producono risultati reattivi, debolmente reattivi o non reattivi "disomogenei", poiché talvolta si riscontrano reazioni con fenomeno di prozona.

Test quantitativo

Repertare il titolo come la diluizione più elevata che produce un risultato reattivo.

Tabella 1. Risultato di test USR quantitativo.

Se i risultati reattivi sono ottenuti con una diluizione 1:32, preparare altre diluizioni seriali al raddoppio in soluzione fisiologica allo 0,9% (1:64, 1:128 e 1:256) e ritestare usando la procedura di test quantitativo.

Non diluito (1:1)	Diluizioni di siero					Referto
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	DR	N	N	N	N	Reattivo, non diluito
R	R	DR	N	N	N	Reattivo, diluizione 1:2
R	R	R	DR	N	N	Reattivo, diluizione 1:4
DR	DR	R	R	DR	N	Reattivo, diluizione 1:8
N (disomogeneo)	DR	R	R	R	N	Reattivo, diluizione 1:16
DR	N	N	N	N	N	Debolmente reattivo, non diluito

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

Se i risultati dei controlli non sono quelli attesi, non refertare i risultati dei campioni.

- I risultati del test USR su siero devono essere confermati mediante un test treponemico.
- La diagnosi di sifilide dipende dai risultati del test USR, dal test treponemico di conferma, dai sintomi e segni clinici e dai fattori di rischio.
- Un test USR reattivo può indicare infezione pregressa o in atto da un treponema patogeno, sebbene possa trattarsi di una reazione falsamente positiva, che viene rilevata nel caso in cui il test treponemico di conferma sia negativo.
- Un test USR non reattivo con evidenza clinica di sifilide, può indicare sifilide precoce, primaria, una reazione di prozona in sifilide secondaria o sifilide tardiva.
- Un test USR non reattivo senza evidenza clinica di sifilide, indica nessuna infezione in atto, un'infezione trattata efficacemente o sifilide latente.
- Un test USR quantitativo rileva le variazioni nel titolo della reagina. Di conseguenza, un campione di siero che evidenzia un aumento di quattro volte nel titolo su un campione ripetuto può indicare una infezione, una reinfezione o il fallimento della terapia. Analogamente, una diminuzione di quattro volte durante il trattamento è indice di terapia della sifilide adeguata.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- I risultati positivi ottenuti usando USR Antigen non devono essere considerati dati probanti del fatto che il paziente sia affetto da sifilide. Per contro, un test USR non reattivo non esclude - di per sé - la diagnosi di sifilide.
- Si può verificare una reazione di prozona in cui viene inibita la reattività con siero realmente positivo non diluito. Il fenomeno di prozona produce spesso risultati debolmente reattivi o non reattivi "disomogenei" nel test qualitativo. I campioni con tali risultati non reattivi devono essere sottoposti a un test quantitativo.
- Reazioni biologiche falsamente positive possono verificarsi con test non treponemici in soggetti tossicodipendenti, che hanno malattie come lupus erythematosus, mononucleosi, malaria, lebbra o polmonite virale oppure sono stati recentemente immunizzati.¹²
- L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.
- La reattività del test può risultare diminuita nel caso in cui la temperatura dell'area di test, dei campioni o dei reagenti sia inferiore a 23 °C, mentre in caso di temperatura superiore a 29 °C, risulta aumentata.¹²
- I risultati del test sono imprevedibili in caso di test di campioni di siero emolizzati, contaminati o estremamente torbidi.
- Velocità e tempi di rotazione non corretti possono determinare risultati inattendibili.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE^{13,14}

Le prestazioni del test su vetrino USR sono state comparate a un test su cartoncino RPR (Rapid Plasma Reagin) e al test su vetrino VDRL, in uno studio condotto da Pettit, Larsen, Pope, Perryman e Adams.¹³ Sono stati eseguiti test quantitativi su 664 sieri di pazienti affetti da sifilide trattati e non trattati in diversi stadi della malattia. Sono stati inclusi anche 95 sieri falsamente positivi e 36 sieri da donatori normali. Il test su vetrino VDRL e il test su cartoncino RPR sono stati usati come base di comparazione con il test USR. I risultati dei test quantitative USR sono risultati paralleli a quelli dei test VDRL e RPR con una concordanza pari a circa l'84%.¹³

In un secondo studio, condotto da Saxena e Ghosh,¹⁴ le prestazioni del test su vetrino USR sono state comparate al test su vetrino standard VDRL e al test di fissazione del complemento (CF). I test sono stati eseguiti su 476 campioni di sangue. I risultati ottenuti, riportati nella tabella seguente, evidenziano che il test USR può rilevare il 93% dei sieri sifilitici reattivi.

Numero di campioni di siero	Risultati del test USR	Risultati del test VDRL	Risultati del test CF
43	+	+	+
2	-	+	-
1	+	-	-
430	-	-	-

DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione
224051	Difco USR Antigen, 6 x 3 mL
235161	Difco USR Test Control Serum Set, 1 set Il set contiene: Nontreponemal Antigen Reactive Serum, 3 mL USR Weakly Reactive Serum, 3 mL Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum, 3 mL Fiaconi di aliquota, 3 fiaconi

BIBLIOGRAFIA: Vedere la sezione "References" nel testo inglese.

BD Difco USR Antigen Difco USR Test Control Serum Set

Español

USO PREVISTO

Difco Unheated Serum Reagin (USR) Antigen (antígeno de reagina de suero sin calentar [USR] **Difco**) se recomienda para su uso en el USR Test para la detección de reagina, una sustancia similar a un anticuerpo, mediante pruebas cualitativas y cuantitativas de floculación en portaobjetos, como método auxiliar en el diagnóstico de la sífilis.

USR Test Control Serum Set son sueros humanos normalizados utilizados para controlar el USR Test.

RESUMEN Y EXPLICACION

Treponema pallidum es el agente causante de la sífilis. La sífilis es una infección crónica con manifestaciones clínicas que ocurren en etapas diferentes. Se recomiendan pruebas de laboratorio específicas para la detección de cada etapa de la enfermedad.

Durante la etapa primaria, las treponemas presentes en la lesión característica, un chancro, son detectables mediante examen al microscopio¹ con campo oscuro o mediante la prueba de anticuerpos con fluorescencia directa para *T. pallidum* (DFA-TP). Durante la etapa secundaria, la mayoría de las pruebas serológicas para sífilis son reactivas y las treponemas pueden detectarse en las lesiones utilizando el examen al microscopio con campo oscuro. El periodo latente, que es asintomático, puede durar años. Las pruebas serológicas son habitualmente reactivas en el primer periodo latente, pero la reactividad de las pruebas no treponémicas se reduce durante la última parte del periodo latente. Los síntomas de la sífilis en la última etapa o terciaria, pueden ocurrir entre 10 y 20 años después de la infección inicial. Aproximadamente el 71% de los pacientes en la etapa terciaria de la sífilis tiene pruebas reactivas no treponémicas^{2,3}. En la etapa terciaria, las pruebas treponémicas a menudo serán reactivas y son la única base de diagnóstico. Las lesiones en la sífilis terciaria presentan pocas treponemas. La neurosífilis y la sífilis cardiovascular tardía son complicaciones de la sífilis terciaria.

Dado que las manifestaciones clínicas de la sífilis pueden confundirse con otras afecciones infecciosas y no infecciosas, el diagnóstico adecuado debe incluir examen al microscopio del material lesionado y los resultados serológicos².

Difco USR Antigen es un antígeno no treponémico formado por cardiolipina, colesterol y lecitina. El antígeno es una modificación de la emulsión de antígeno del Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) en una solución de suspensión USR. La suspensión de antígeno contiene cloruro de colina que favorece la reactividad de la reagina en suero sin calentar⁴. El USR Test es adecuado para las determinaciones cualitativas y cuantitativas.

Las pruebas no treponémicas miden la reagina, una sustancia similar a un anticuerpo que puede detectarse en el suero de una muestra con sífilis. La reagina también se encuentra de vez en cuando en el suero de personas con otras enfermedades agudas o crónicas. Las pruebas no treponémicas reactivas favorecen el diagnóstico de la sífilis subclínica latente y son herramientas eficaces para detectar los casos en investigaciones epidemiológicas. Las pruebas no treponémicas son superiores a las pruebas treponémicas por seguir la respuesta al tratamiento⁵.

Las pruebas con antígeno no treponémico no son completamente específicas para sífilis, ni tampoco presentan una sensibilidad satisfactoria en todas las etapas de sífilis. Siempre que la prueba de antígeno no treponémico no guarde relación con la impresión clínica, se debe realizar una prueba de antígeno treponémico tal como la prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS)^{2,3}. Las pruebas no treponémicas tales como USR se utilizan para evaluar el suero del paciente y proporcionar evidencia de sífilis sólo presuntiva. Las pruebas treponémicas tales como FTA-ABS se utilizan para confirmar los resultados. La probabilidad de obtener un resultado del USR Test reactivo en diversas etapas de la sífilis no tratada, se ha informado de la manera siguiente³:

Etapas de sífilis sin tratar	% reactivo
Primario	80
Secundario	100
Latente	95

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En el procedimiento de USR Test, el suero sin calentar del paciente se mezcla con una suspensión de solución salina con tampón de USR Antigen con cardiolipina, lecitina y colesterol. La combinación de reagina y USR Antigen forma una aglutinación microscópica denominada floculación.

REACTIVOS

USR Antigen está formado por 0,03% de cardiolipina y 0,9% de colesterol disueltos en alcohol absoluto con suficiente lecitina (aproximadamente 0,2%) para producir una reactividad estándar. El antígeno se suspende en una solución con EDTA, cloruro de colina y fosfato con 0,2% de timerosal como conservante^{5,6}.

USR Test Control Serum Set contiene 3 mL por unidad, de los siguientes sueros humanos liofilizados con 0,02% de timerosal como conservante:

- Nontreponemal Antigen Reactive Serum
- USR Weakly Reactive Serum
- Nontreponemal Antigen Nonreactive Serum

Estos agentes se han estandarizado para proporcionar lecturas reactivas, débilmente reactivas o no reactivas, cuando se analizan según el procedimiento del USR Test.

Advertencias y precauciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- ¡ADVERTENCIA! REACTIVOS CON POSIBLE RIESGO BIOLÓGICO.** Cada unidad donante utilizada para preparar USR Test Control Serum Set fue analizada mediante un método de licencia de FDA para determinar la presencia de anticuerpos al virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y el antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg) y se han determinado resultados negativos (no fueron reactivos repetidas veces).
- Debido a que ningún método de análisis puede ofrecer una garantía total de la ausencia del HIV, del virus de hepatitis B y de otros agentes infecciosos, las muestras y las soluciones de control deben manipularse como si fueran capaces de transmitir una enfermedad infecciosa. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales, deben seguirse las "Precauciones estándar"⁷⁻¹⁰ y las directrices del centro.
- USR Test Control Serum Set**
El envase de este producto contiene goma natural seca.

Almacenamiento: Almacenar USR Antigen a 2 - 8 °C. Si la cantidad original de 3 mL supera lo que se necesita para un periodo de análisis, transferir el resto del uso de primer día a uno o más frascos de alícuota y almacenar a 2 - 8 °C.

Almacenar los sueros liofilizados en USR Test Control Serum Set a 2 - 8 °C. Almacenar los sueros de control rehidratados a 2 - 8 °C o dividirlos en alícuotas suficientes para un día de análisis y almacenarlos a -20 °C. No descongelar y volver a congelar.

Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.

Deterioro del producto: La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro.

RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Recoger una muestra de sangre mediante punción aséptica de una vena en un tubo seco y limpio, sin anticoagulante. Después de coagularse la muestra, centrifugarla a 1500 - 2000 rpm durante 5 min para obtener el suero de análisis. Almacenar las muestras de suero a temperatura ambiente durante no más de 4 h; para almacenamiento prolongado, mantener a 2 - 8 °C durante un máximo de 5 días o mantener por debajo de -20 °C. Las muestras de suero deben ser transparentes, libres de hemólisis, y sin evidencia de contaminación bacteriana, tal como turbidez o partículas. Consultar las referencias correspondientes para obtener información adicional acerca de la recogida de las muestras^{2,11,12}.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: **Difco** USR Antigen, **Difco** USR Test Control Serum Set.

Materiales necesarios pero no suministrados: 0,9% de solución salina, jeringa de vidrio no desechable de 1 - 2 cc, agujas calibradas no desechables de calibre 18, sin frente, micropipetas de 50 µL, pipetas serológicas graduadas hasta la punta: 1,0 mL, graduadas en 1/100 mL; 5,0 mL, graduadas en 1/10 mL; 10,0 mL, graduadas en 1/10 mL.

Portaobjetos de 5,08 x 7,62 cm aproximadamente con aros de parafina o cerámica de aproximadamente 14 mm de diámetro con una altura suficiente para evitar el derrame durante la rotación.

SopORTE para portaobjetos de 5,08 x 7,62 cm.

Agitador rotativo mecánico, ajustable a 180 ± 2 rpm que realice un círculo de 19 mm de diámetro en un plano horizontal.

Microscopio óptico con ocular de 10X y objetivo de 10X, agua purificada estéril, alcohol absoluto, acetona, reloj, aplicadores.

Preparación del reactivo: Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente (23 - 29 °C) antes de realizar las pruebas. Asegurarse de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos de detergente.

USR Antigen está listo para su utilización.

USR Test Control Serum Set: Para reconstituir los sueros de control, agregar 3 mL de agua purificada estéril y girar suavemente para disolver por completo el contenido.

Preparación del material de vidrio específico:

Jeringas con agujas:

- Enjuagar previamente con agua del grifo.
- Empapar y lavar a mano profundamente en una solución de detergente para material de vidrio.
- Enjuagar con agua del grifo de 6 a 8 veces.

4. Enjuagar con agua purificada sin utilizar.
5. Enjuagar con alcohol absoluto.
6. Enjuagar con acetona.
7. Dejar secar al aire hasta que el olor de acetona se elimine completamente.
8. Quitar las agujas de las jeringas para su almacenamiento.

Portaobjetos con aros de cerámica:

1. Enjuagar previamente con agua del grifo.
2. Lavar con una solución de detergente para material de vidrio. No dejar en la solución de detergente durante un periodo prolongado los portaobjetos con aros de cerámica porque éstos se pueden quebrar y desprenderse.
3. Enjuagar con agua del grifo de 3 a 4 veces.
4. Enjuagar con agua purificada sin usar.
5. Secar con un paño limpio y libre de pelusa. Si los portaobjetos limpios no permiten la distribución uniforme del suero dentro de la superficie interna del círculo, realizar lo siguiente.
6. Limpiar los portaobjetos con un limpiador que no raye.
7. Enjuagar, secar y pulir con un paño limpio libre de pelusa.

Análisis de exactitud de la aguja de suspensión de antígeno

1. La exactitud de la prueba depende de la cantidad de suspensión de antígeno utilizada. Comprobar la calibración de la aguja periódicamente para asegurar el suministro del volumen correcto de la suspensión de USR Antigen.
2. Para las pruebas cuantitativas y cualitativas en el suero, dosificar la suspensión de antígeno con una jeringa con una aguja de calibre 18 sin frente que suministrará 45 ± 1 gotas de suspensión de antígeno por mL cuando se la sostiene en posición vertical.
3. Colocar la aguja en una jeringa de 1 mL. Llenar la jeringa con 0,5 mL de suspensión USR Antigen. Sosteniendo la jeringa en posición vertical, contar el número de gotas suministradas en 0,5 mL. La aguja está calibrada correctamente si se suministran entre 22 y 23 gotas en 0,5 mL.
4. Ajustar o reemplazar la aguja si no cumple con esta especificación. Repetir la calibración en la aguja nueva o ajustada.
5. Después de cada día de uso limpiar la aguja de dosificación, el frasco y la jeringa enjuagándolos con agua, alcohol y acetona, en dicho orden. Quitar la aguja de la jeringa después de la limpieza.

Prueba cualitativa en portaobjetos de USR en suero

Para obtener resultados de pruebas reproducibles y fiables, la suspensión de USR Antigen, los controles y las muestras de prueba deben encontrarse a 23 - 29 °C cuando se realizan las pruebas.

1. Dosificar mediante pipeta 50 µL de suero sin calentar en un aro de un portaobjetos con aro de parafina o cerámica mediante una pipeta segura. No utilizar un portaobjetos de vidrio con concavidades, pocillos o aros de vidrio. Esparcir el suero con el movimiento circular de la punta de la pipeta de manera que el suero cubra toda la superficie interna del aro de parafina o cerámica.
2. Girar suavemente para volver a suspender el USR Antigen y quitar la cantidad deseada con una jeringa con aguja.
3. Sostener la jeringa y la aguja con suspensión de USR Antigen en posición vertical. Dosificar varias gotas para quitarle el aire a la aguja. Dejar caer exactamente una gota (22 µL) de suspensión de antígeno a cada círculo con suero. No permitir que la aguja toque el suero.
4. Colocar el portaobjetos en un agitador mecánico. Rotar el portaobjetos durante 4 min a 180 ± 2 rpm. Si el ambiente es seco, cubrir los portaobjetos con una tapa humidificadora mojada durante la rotación para evitar la evaporación excesiva.
5. Inmediatamente después de rotar el portaobjetos, quitar el portaobjetos del agitador rotativo y efectuar la lectura de los resultados de prueba al microscopio, utilizando un ocular 10X y un objetivo 10X.

Prueba cuantitativa USR en suero

1. Para realizar un recuento de las muestras de suero hasta obtener una titulación según criterio de valoración, preparar las diluciones de suero en el portaobjetos en una concentración de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8, de la manera siguiente.
2. Dosificar 50 µL de 0,9% de solución salina en los círculos 2 - 4. No esparcir la solución salina.
3. Dosificar 50 µL de suero en los círculos 1 y 2.
4. Mezclar la solución salina y el suero en el círculo 2 extrayendo y expulsando la mezcla hacia arriba y hacia abajo en la pipeta aproximadamente 8 veces. Mezclar suavemente para evitar burbujas.
5. Transferir 50 µL del círculo 2 (1:2) al círculo 3 y mezclar.
6. Transferir 50 µL del círculo 3 (1:4) al círculo 4 (1:8), mezclar, y luego descartar 50 µL del círculo 4.
7. Esparcir el contenido de cada círculo para llenar la superficie interna del aro utilizando un aplicador limpio para cada círculo.
8. Sosteniendo la jeringa y la aguja con suspensión de USR Antigen en posición vertical, dosificar varias gotas para quitar el aire a la aguja. Luego, dejar caer exactamente 1 gota (22 µL) de suspensión de antígeno a cada círculo con suero. No permitir que la aguja toque el suero.
9. Colocar el portaobjetos en el agitador rotativo mecánico. Girar el portaobjetos durante 4 min a 180 ± 2 rpm. Si el ambiente es seco, cubrir los portaobjetos con una tapa humidificadora mojada durante la rotación para evitar la evaporación excesiva.
10. Inmediatamente después de la rotación del portaobjetos, quitar el mismo del agitador rotativo y efectuar la lectura de los resultados de la prueba al microscopio con un ocular de 10X y un objetivo de 10X.
11. Si la dilución mayor analizada (1:8) es reactiva, preparar una dilución de 1:8 de la muestra de prueba añadiendo 0,1 mL de suero a 0,7 mL de solución salina al 0,9%. Mezclar bien. Repetir la prueba como en los pasos 1 - 9 anteriores.

Control de calidad del usuario

Analizar la reactividad de suspensión del antígeno con sueros de control (reactivo, débilmente reactivo y no reactivo). Utilizar la suspensión de antígeno solamente si produce la reactividad prevista con los sueros de control (reactivo, débilmente reactivo y no reactivo).

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de NCCLS y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

Procedimiento cualitativo

1. Leer y registrar los resultados de la manera siguiente:
Grumos medianos a grandes: reactivo (R)
Grumos pequeños: débilmente reactivo (DR)
Ausencia de grumos o rugosidad muy leve: no reactivo (N)
2. Verificar que los resultados de suero de control sean los previstos. Si las reacciones no son las previstas, la prueba no es válida y no pueden informarse los resultados.
3. Realizar una prueba cuantitativa en todas las muestras de suero que producen resultados reactivos, débilmente reactivos o no reactivos "rugosos", dado que las reacciones prozona pueden producirse de vez en cuando.

Procedimiento cuantitativo

Informar la titulación como la dilución más elevada que produce el resultado reactivo.

Tabla 1. Ejemplo de resultado del USR Test cuantitativo.

Si los resultados reactivos se obtienen mediante la dilución 1:32, preparar más diluciones seriadas de 1:2 en solución salina al 0,9% (1:64, 1:128 y 1:256) y repetir la prueba con el procedimiento de prueba cuantitativa.

No diluido (1:1)	Diluciones de suero					Informe
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	DR	N	N	N	N	Reactivo, no diluido
R	R	DR	N	N	N	Reactivo, dilución 1:2
R	R	R	DR	N	N	Reactivo, dilución 1:4
DR	DR	R	R	DR	N	Reactivo, dilución 1:8
N (rugoso)	DR	R	R	R	N	Reactivo, dilución 1:16
DR	N	N	N	N	N	Débilmente reactivo, no diluido

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Si los controles del análisis no dan los resultados previstos, no deben informarse los resultados del paciente.

1. Los resultados del suero del USR Test deben confirmarse con una prueba treponémica.
2. El diagnóstico de sífilis depende de los resultados del USR Test, la prueba de confirmación treponémica, indicios y síntomas clínicos y factores de riesgo.
3. Un USR Test reactivo puede indicar una infección pasada o presente con un treponema patógeno. Sin embargo, puede tratarse de una reacción positiva falsa. Un resultado positivo falso se determina si la prueba treponémica de confirmación es negativa.
4. Un USR Test no reactivo con signos clínicos de sífilis puede indicar una sífilis en la primera etapa o etapa primaria, una reacción prozona en sífilis secundaria o una sífilis en etapa tardía.
5. Un USR Test no reactivo con ausencia de signos clínicos de sífilis indica falta de infección actual, una infección tratada eficazmente o sífilis latente.
6. Un USR Test cuantitativo detecta cambios en la titulación de reagina. Por tanto, una muestra de suero con un incremento de cuatro veces en la titulación en una muestra repetida puede indicar una infección, una reinfección o un tratamiento fallido. Asimismo, una reducción de cuatro veces durante el tratamiento indica un tratamiento adecuado de la sífilis.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Los resultados positivos obtenidos mediante USR Antigen no deben considerarse como evidencia definitiva de que el paciente sufre de sífilis. Por el contrario, con un USR Test no reactivo, de por sí no se puede eliminar la posibilidad de diagnóstico de sífilis.

- Se puede producir una reacción prozona en la que esté inhibida la reactividad con un suero sin diluir positivo verdadero. El fenómeno prozona a menudo da resultado débilmente reactivo o no reactivo "rugoso" en las pruebas cualitativas. Las muestras con dichos resultados no reactivos deben ser analizadas mediante pruebas cuantitativas.
- Las reacciones biológicas positivas falsas pueden producirse en pruebas no treponémicas de personas que abusan de las drogas, tienen enfermedades tales como lupus eritematosus, mononucleosis, paludismo, lepra o neumonía, o que recientemente han recibido vacunación¹².
- Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.
- Si la temperatura del área de análisis, las muestras o los reactivos se encuentran por debajo de los 23 °C, la reactividad de la prueba se reduce. Si la temperatura es superior a 29 °C, la reactividad de la prueba se incrementa¹².
- Los resultados de la prueba no son predecibles cuando se realizan análisis con muestras de suero con hemólisis, contaminación o turbidez extrema.
- Los resultados de la prueba pueden ser erróneos si la velocidad y el tiempo de rotación no son los correctos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO^{13,14}

El rendimiento del USR Test en portaobjetos se comparó con una prueba rápida de reagin en plasma (RPR) en tarjeta y la prueba VDRL en portaobjetos en un estudio realizado por Pettit, Larsen, Pope, Perryman y Adams¹³. Las pruebas cuantitativas se realizaron en 664 sueros con sífilis de pacientes tratados y no tratados en diferentes etapas de la enfermedad. También se incluyeron 95 sueros positivos falsos y 36 sueros de donantes normales. La prueba VDRL en portaobjetos y la prueba RPR en tarjeta se utilizaron como base de comparación con el USR Test. Los resultados de las pruebas cuantitativas de USR se analizaron en paralelo con las pruebas de VDRL y RPR, lo que produjo aproximadamente 84% de concordancia¹³.


En un segundo estudio, realizado por Saxena y Ghosh¹⁴, el rendimiento del USR Test en portaobjetos se comparó a la prueba VDRL en portaobjetos estándar y la prueba de fijación complementaria (CF). Se realizaron las pruebas en 476 muestras de sangre. Los resultados obtenidos se registraron en la tabla a continuación y muestran que el USR Test puede detectar 93% de los sueros reactivos con sífilis.


Número de sueros	Resultados del USR Test	Resultados del VDRL test	Resultados del CF test
43	+	+	+
2	-	+	-
1	+	-	-
430	-	-	-


DISPONIBILIDAD


Nº de cat.	Descripción
224051	Difco USR Antigen, 6 x 3 mL
235161	Difco USR Test Control Serum Set, 1 conjunto Componentes del conjunto: Suero reactivo de antígeno no treponémico, 3 mL Suero débilmente reactivo USR, 3 mL Suero no reactivo de antígeno no treponémico, 3 mL Frascos de alicuota, 3 frascos


REFERENCIAS: Véase la sección "Referencias" en el texto inglés.


 Manufacturer / Producent / Fabrikant / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Ditta produttrice / Fabrikant / Fabricante / Tillverkare


 In Vitro Diagnostic Medical Device / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik


 Catalog number / Katalognummer / Catalogusnummer / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Numero di catalogo / Katalognummer / Número do catálogo / Número de catálogo / Katalognummer


 Authorized Representative in the European Community / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierter EG-Vertreter / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Autoriseret representant i EU / Representante autorizado na União Europeia / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU


 Temperature limitation / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimiet / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Temperatura limite / Temperaturbegrænsning / Limitação da temperatura / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning


 Use by / Anvendes for / Houdbaar tot / Viimeikäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Usare entro / Brukes for / Utilizar em / Usar antes de / Använd före / YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) / ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af måned) / JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) / VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) / AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) / JJJ-MM-TT / JJJ-MM (MM = Monatsende) / EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) / AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) / ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutten av måneden) / AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin do mês) / aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) / ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden)

 Batch Code (Lot) / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Codice del lotto (partita) / Batch-kode (Serie) / Código do lote (Lote) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti)

 Consult Instructions for Use / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultare le istruzioni per l'uso / Se i brugsanvisningen / Consulte as instruções de utilização / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen

 Control / Kontrol / Controle / Kontrolli / Contrôle / Kontrolle / Έλεγχος / Controllo / Kontroll / Controllo / Control / Kontroll

 Biological Risks / Biologiske risici / Biologiske risiko's / Tartuntavaara / Risques biologiques / Biogefährlich / Βιολογικοί κίνδυνοι / Rischii biologici / Biologisk risiko / Perigos biológicos / Riesgos biológicos / Biologisk risk

 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

 BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

Difco is a trademark of Difco Laboratories, a subsidiary of Becton, Dickinson and Company. BD and BD Logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2003 BD.