

# TPHA

CONTENU			
REF	2520005	TPHA	200 tests
Uniquement pour Diagnostic in vitro			

## TPHA

Détermination des anticorps anti-*Treponema pallidum*

HEMAGGLUTINATION SUR MICROPLATE

### PRINCIPE

Le TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination) est un test spécifique d'hémagglutination pour la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps anti *T. pallidum* dans le sérum humain. Les érythrocytes stabilisés de poulet sensibilisés avec une solution antigénique de *T. pallidum*, agglutinent en présence anti des anticorps de *T. pallidum* pour donner un modèle caractéristique.

### COMPOSITION DES REACTIFS

<b>R1</b>	<b>Suspension de Cellules test.</b> Erythrocytes stabilisés de poulet enduits d'antigène de <i>T. pallidum</i> (antigène de recombinaison), pH 7,2. Contient 0,95 g/L d'azoture de sodium.
<b>R2</b>	<b>Suspension de Cellules de Contrôle.</b> Érythrocytes de poulet stabilisés et non-enduits, pH 7,2. Contient 0,95 g/L d'azoture de sodium.
<b>R3</b>	<b>Diluant.</b> Solution saline tamponnée contenant des composants solubles de <i>T. reiter</i> , pH 7,2. Contient 0,95 g/L d'azoture de sodium.
<b>CONTROL+</b>	Sérum immunisé de lapin, prédilué au 1/20. Contient 0,95 g/L d'azoture de sodium.
<b>CONTROL-</b>	Sérum animal, prédilué au 1/20. Contient 0,95 g/L d'azoture de sodium. (Ref. 2925805)

**Avertissement:** Les réactifs dans ce kit contiennent l'azoture de sodium. Ne pas laisser en contact avec la peau ou les membranes muqueuses.

### CONDITIONNEMENT

<b>REF</b>	2520005 kit 200 tests. 1 x 15 mL de Suspension de Cellules Test, 1 x 15 mL de Suspension de Cellules de Contrôle, 1 x 45 mL de Diluant, 1 x 1 mL de contrôle positif, 1 x 1 mL de contrôle négatif.
------------	--

### CONSERVATION ET STABILITE

Conservé à 2-8°C. Conserver les tubes en position verticale. La conservation des tubes en position horizontale peut occasionner la formation d'agrégats cellulaires. Ne pas geler. Les Réactifs gelés pourraient changer la fonctionnalité du test. Les réactifs et les contrôles sont stables jusqu'à la date d'expiration mentionnée sur l'étiquette.

### PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs et les contrôles sont prêts à l'emploi.

### ECHANTILLONS

Sérum frais et clair. Des échantillons devraient être stockés à 2-8 °C pendant 5 jours ou à -20 °C pendant de plus longues périodes.

### MATERIAL AUXILIAIRE

- Pipettes automatiques.
- Plaques de micro titration en puits "U". (Seulement pour un à usage unique).

### PROCEDURE

1. Porter les réactifs et les échantillons à la température ambiante (Note1).
2. Mélanger vigoureusement les flacons de suspension de cellules (R1 et R2) avant emploi.

#### I. Test Qualitatif

Chaque test exige 3 puits de la microplaque.

1. Pipeter 190 µL du diluant (R3) dans le puits 1.
2. Pipeter 10 µL d'échantillon dans le puits 1. Mélanger et transférer 25 µL du puits 1 au puits 2 et 3.
3. Pipeter 75 µL des cellules de contrôle (R2) dans le puits 2.
4. Pipeter 75 µL des cellules de test (R1) dans le puits 3.
5. Tapoter la microplaque doucement pour mélanger.
6. Couvrir la microplaque et incubé à la température ambiante pendant 45-60 minutes (Note 2).
7. Examiner macroscopiquement les modèles d'agglutination des cellules.

Puits n°	1	2	3
Diluant (R3) (µL)	190		
Échantillon (µL)	10		
Mélanger et transférer 25 µL			
Dilutions	1:20	1:20	1:20
Cellules Contrôle (R2) (µL)		75	
Cellules Test (R1) (µL)			75
Dilution finale		1:80	1:80

#### Lecture et interprétation

Lire les résultats en comparant les modèles d'agglutination des cellules de test aux cellules de contrôle (Note 3). Des lectures sont marquées et rapportées selon les critères suivants:

Degré d'hémagglutination	Lecture	Résultat
Tapis lisse des cellules couvrant le fond entier du puits, parfois de bords plissés.	4+	Réactif
Tapis lisse des cellules couvrant une partie du fond du puits.	3+	Réactif
Tapis lisse des cellules entourées par un cercle rouge.	2+	Réactif
Tapis lisse des cellules couvrant moins de surface et entourées par un plus petit cercle rouge.	1+	Réactif
Bouton des cellules ayant un petit trou au centre.	±	Limite
Bouton compact défini des cellules, parfois avec un trou très petit au centre.	-	Négatif

Tout modèle d'agglutination montré par les cellules de Contrôle indique la présence d'anticorps non spécifiques (Note 4) et ne peut pas être interprété. Des échantillons avec un modèle limite devraient être testés de nouveau et être rapportés comme négatifs si le même modèle est reproduit. Les échantillons réactifs devraient être titrés suivant la méthode semi-quantitative.



## I. Test Semi-quantitatif

Chaque test exige 8 puits.

1. Pipeter 25 µL du diluant (R3) pour les puits de 2 à 8 d'une rangée de la microplaque.
2. Transférer 25 µL de la dilution 1:20 du puits 1 du test qualitatif aux puits 1 et 2 de la rangée avant.
3. Faire des dilutions en série par transfert de 25 µL à partir du puits 2 jusqu'au puits 8. Jeter le dernier 25 µL du puits 8.
4. Pipeter 75 µL des cellules test (R1) du puits 1 à 8.
5. Procéder comme décrit dans les étapes 5, 6, 7 du test qualitatif.

### Lecture

De même que dans le test qualitatif. Le titre de l'échantillon est rapporté comme la dilution la plus élevée qui montre une réactivité. La prochaine dilution plus élevée devrait être négative.

## CONTROLE DE QUALITE

Les contrôles positif et négatif devraient être quotidiennement exécutés en tenant compte qu'ils sont pré dilués au 1:20.

Mélanger dans 2 puits différents, 25 µL de chaque contrôle avec 75 µL des cellules test (R1) et procéder comme décrit dans le test qualitatif.

Le contrôle négatif ne devrait montrer aucun modèle d'agglutination avec les cellules test et de contrôle.

Le contrôle positif devrait seulement montrer des modèles d'agglutination avec les cellules test.

## INTERET CLINIQUE 1-3

La syphilis, provoqué par *Treponema pallidum*, est une infection chronique avec des manifestations cliniques diverses qui se produisent aux distinctes phases de la maladie. Les anticorps anti *T. pallidum* apparaissent dans la première phase et peut persister chez 85-90% de patients traités et guéris. Puisque cette pathologie fréquemment ne donne pas de symptômes et son contagion est prolongé, il est essentiel d'employer des tests sérologiques fortement sensibles et spécifiques pour sa détection.

## CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES

- Sensibilité analytique: La sensibilité du réactif est calibrée contre le 1er standard international pour le sérum syphilitique (OMS).
- Effet de Prozone : Aucun effet de prozone n'a été détecté jusqu'aux titres  $\geq 1/163840$  (Note 5).
- Sensibilité diagnostique: 99,6 %.
- Spécificité diagnostique: 100 %.
- Les résultats obtenus avec ce réactif n'ont pas montré des différences significatives en comparaison avec des réactifs de référence. Les détails des expériences de comparaison sont disponibles sur demande.
- La bilirubine (< 20 mg/dL), l'hémoglobine (< 10 g/L), les lipides (< 10 g/L) et les facteurs rhumatoïdes (< 300 IU/mL), n'interfèrent pas. D'autres substances peuvent interférer<sup>7</sup>.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Le test de TPHA ne peut pas distinguer des anticorps *anti T. pallidum* des anticorps d'autres tréponèmes pathogènes (c.-à-d. *T. pertenue* et *T. carateum*). Il est recommandé que tous les résultats positifs doivent être confirmés par la méthode alternative de FTA-ABS.
- Des résultats faux positifs ont été décrits avec des groupes de patients présentant la mononucléose, la lèpre, la borréliose, les maladies auto-immunes et chez les patients à la drogue.<sup>3</sup>

- Les résultats faux négatifs peuvent résulter du diagnostic précoce de la syphilis active ou tardif de la syphilis latente. Il est recommandé pour accomplir le profil des résultats de réaliser le test aux cardiolipides (RPR ou VDRL) dans le cas de la syphilis active.
- Le test de TPHA n'est pas utile pour déterminer l'efficacité de la thérapie, puisque les anticorps restent long temps après que la maladie ait été médicalement traitée et le test demeure positif.
- Le diagnostic clinique ne devrait pas être basé sur les seuls résultats de test simple, mais devrait intégrer les données cliniques et de laboratoire.

## NOTES

1. La sensibilité du test peut être réduite à des basses températures. Les meilleurs résultats sont réalisés à 15-25°C.
2. Garder la microplaque hors des vibrations, de la chaleur et de la lumière du soleil.
3. Le modèle d'agglutination des cellules de contrôle ne devrait pas être employé comme référence pour des résultats négatifs puisque les cellules de contrôle donnent un bouton plus compact que les cellules de test.
4. Le protocole suivant peut être utilisé pour éviter les réactions non spécifiques : Ajouter le 10 µL de l'échantillon au 190 µL des cellules de contrôle (R2). Mélanger et incubé pendant 30 minutes. Centrifuger à 2000 r.p.m. pendant 3 mn et examiner le surnageant comme échantillon sans la dilution prévue de 1:20.
5. Les sérums avec un niveau élevé des anticorps peuvent donner des modèles d'agglutination avec des bords très plissés.
6. Ne lire pas le résultat après 60 min.

## SOURCES D'ERREURS

- La contamination bactérienne des contrôles et des échantillons aussi bien que les réactifs de suspension de cellules gelés et dégelés peuvent mener aux résultats incorrects.
- Le kit de TPHA ne doit pas être employé au delà de sa date d'échéance parce qu'un stockage prolongé peut affecter la sensibilité de la suspension de cellules test. Les plaques de micro-titration réutilisées peuvent causer des résultats incorrects.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Larsen Sandra A, et al. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 1-21 (1995).
2. Larsen Sandra A et al. *A manual of test for Syphilis*. APHS. 1-192 (1990).
3. Schmidt George P. *Current Opinion in Infectious Diseases* 7: 34-40 (1994).
4. D'Errico MM, et al. *European Journal of Epidemiology* 12: 77-80 (1996).
5. Sequeira P.J.L. *Br J Vener Dis* 59: 145-150 (1983).
6. Tomizawa T et al. *Jap L Med Sci Biol* 19: 305-308 (1967).
7. Young D.S. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, 4<sup>th</sup> ed. AACC Press (1995).

