

TPHA

PRESENTACION			
REF	2520005	TPHA	200 Tests
Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i>			

TPHA

Determinación de anticuerpos anti-Treponema pallidum

HEMAGLUTINACION EN MICROPLACA

FUNDAMENTO

TPHA (*Treponema Pallidum Haemagglutination*) es una prueba específica de hemaglutinación en microplaca para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* en suero humano. Hematíes de ave estabilizados y sensibilizados con una solución antigénica de *T. pallidum*, aglutinan en presencia de anticuerpos anti-*T.pallidum* mostrando unos modelos de aglutinación característicos.

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

- R1** **Suspensión de Células Test.** Hematíes estabilizados de pollo, sensibilizados con antígeno de *T.pallidum* (antígeno recombinante), pH 7,2. Contiene 0,95 g/L de azida sódica.
- R2** **Suspensión de Células Control.** Hematíes estabilizados de pollo, sin sensibilizar, pH 7,2. Contiene 0,95 g/L de azida sódica.
- R3** **Diluyente.** Solución salina tamponada que contiene componentes solubles de *T.reiter*, pH 7,2. Contiene 0,95 g/L de azida sódica.
- CONTROL +** Suero de conejo inmune, prediluido 1/20. Contiene 0,95 g/L de azida sódica.
- CONTROL -** Suero animal, prediluido 1/20. Contiene 0,95 g/L de azida sódica. (Ref. 2925805)

Aviso: Los reactivos de este kit contienen azida sódica. Evitar el contacto con la piel y mucosas.

CONTENIDO DEL ENVASE

- REF** 2520005 kit 200 tests.
1x15 mL Suspensión de Células Test, 1x15 mL Suspensión de Células Control, 1x45 mL Diluyente, 1x1 mL Control Positivo, 1x1 mL Control Negativo.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C, en posición vertical. No congelar los componentes del kit ya que podría verse afectada la funcionalidad del test.
El Reactivo y los Controles son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

El Reactivo y los Controles están listos para su uso.

MUESTRAS

Suero reciente.
Las muestras pueden guardarse a 2-8°C durante 5 días, o a -20°C por un periodo mayor.

EQUIPO ADICIONAL

- Pipetas automáticas.
- Microplacas de fondo en U. (**De un solo uso**).

TECNICA

1. Equilibrar los reactivos y muestras a temperatura ambiente (Nota 1).
2. Resuspender vigorosamente los viales de Células Test y Control (R1 y R2).

I. Prueba cualitativa

Cada ensayo requiere utilizar 3 pocillos de la microplaca.

1. Pipetear 190 µL de Diluyente (R3) en el pocillo 1.
2. Pipetear 10 µL de muestra y añadir al pocillo 1. Mezclar el contenido del pocillo y transferir 25 µL al pocillo 2 y 25 µL al pocillo 3.
3. Pipetear 75 µL de Células Control (R2) y añadir al pocillo 2.
4. Pipetear 75 µL de Células Test (R1) y añadir al pocillo 3.
5. Golpear suavemente la placa hasta la homogenización completa de las mezclas.
6. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 45-60 min (Nota 2).
7. Examinar macroscópicamente los modelos de aglutinación de las células.

Pocillo nº	1	2	3
Diluyente (R3) (µL)	190		
Muestra (µL)	10	↑	↑
Mezclar y transferir 25 µL			
Diluciones	1:20	1:20	1:20
Células Control(R2) (µL)		75	
Células Test (R1) (µL)			75
Dilución final		1:80	1:80

Lectura e interpretación

Leer los resultados comparando los modelos de aglutinación de las Células Test con los de las Células Control (Nota 3). Los resultados se evalúan de acuerdo con los siguientes criterios:

Grado de aglutinación	Lectura	Resultado
Capa de células lisas que recubre por completo el fondo del pocillo, algunas veces con los bordes plegados	4+	Reactivo
Capa de células cubriendo parte del fondo del pocillo	3+	Reactivo
Capa de células lisas rodeada por un círculo rojo	2+	Reactivo
Capa de células cubriendo menos área y rodeadas por un círculo rojo	1+	Reactivo
Botón de células con un pequeño orificio en el centro	±	Límite
Botón compacto y definido de células, a veces con un pequeño orificio en el centro	-	Negativo



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Cualquier aglutinación mostrada con las Células Control, indica la presencia de anticuerpos inespecíficos y no debe interpretarse (Nota 4).

Las muestras con modelos de aglutinación límite deben ser reensayadas e interpretadas como negativas si se produce el mismo modelo de aglutinación.

Las muestras positivas deben ser tituladas según la prueba semi-cuantitativa.

II. Prueba semi-cuantitativa

Cada ensayo requiere 8 pocillos.

1. Pipetear 25 µL de Diluyente (R3) desde el pocillo 2 al 8 de una fila de la microplaca.
2. Transferir 25 µL de la dilución 1:20 del pocillo 1 de la prueba cualitativa a los pocillos 1 y 2 de la fila anterior.
3. Realizar diluciones dobles de 25 µL desde el pocillo 2 hasta el 8. Descartar los últimos 25 µL.
4. Pipetear 75 µL de Células Test (R1) a todos los pocillos del 1 al 8.
5. Seguir como en los apartados 5, 6 y 7 de la prueba cualitativa.

Lectura e Interpretación

La misma que en la prueba cuantitativa. El título de la muestra corresponde a la dilución mayor que muestra resultado positivo. La dilución siguiente debería ser negativa.

CONTROL DE CALIDAD

Incluir diariamente controles positivo y negativo para confirmar el correcto funcionamiento del reactivo, teniendo en cuenta que ya están previamente diluidos 1:20.

Mezclar en 2 pocillos distintos, 25 µL de cada control con 75 µL de Células Test (R1) y proceder como en la prueba cualitativa.

El Control Negativo no debe mostrar aglutinación con Células Test ni con Células Control.

El Control Positivo solo debe mostrar aglutinación con las Células Test.

SIGNIFICADO CLINICO¹⁻³

La sífilis es una enfermedad venérea crónica causada por el agente patógeno *Treponema pallidum*, que presenta manifestaciones diversas en distintos estadios. Los anticuerpos anti-*Treponema* aparecen a partir de la primera fase y pueden permanecer en un 85-90% de pacientes tratados a pesar de haber superado la enfermedad. Debido a que la patología frecuentemente no manifiesta síntomas ni señales, y que el periodo de contagio es prolongado, es esencial el uso de un ensayo serológico sensible y específico como prueba de cribado.

CARACTERISTICAS FUNCIONALES

- **Sensibilidad analítica:** Le sensibilidad del reactivo está calibrada frente al 1º Suero Estándar Internacional de Sífilis (OMS).
- **Efecto prozona:** No se observa efecto prozona hasta títulos \geq 1/163840 (Nota 5).
- **Sensibilidad diagnóstica:** 99,6 %.
- **Especificidad diagnóstica:** 100 %.
- Los resultados obtenidos con este reactivo no muestran diferencias significativas al ser comparados con un reactivo de referencia. Los datos analíticos del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- La hemoglobina (<10 mg/dL), bilirrubina (<20 mg/L), lipemia (<10 g/L) y los factores reumatoides (< 300 UI/mL), no interfieren con el ensayo. Otras sustancias pueden interferir⁷.

- El ensayo de TPHA no discrimina entre anticuerpos anti-*T. pallidum* y otras especies de treponemas patógenos (e. *T. pertenue* y *T. carateum*). Es recomendable confirmar todos los resultados positivos con técnicas alternativas como FTA-Abs.
- Se han descrito reacciones falsamente positivas en muestras de pacientes con mononucleosis, lepra, borreliosis, enfermedades autoinmunes y drogadicción.
- Pueden obtenerse resultados falsamente negativos en sífilis temprana activa y sífilis latente. Se recomienda completar el perfil serológico realizando ensayos cardiolipínicos (RPR o VDRL) in casos de sífilis activa.
- La prueba de TPHA no es útil para controlar la eficacia del tratamiento, ya que el nivel de anticuerpos permanece mucho tiempo después de la curación de la enfermedad.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

NOTAS

1. La sensibilidad del ensayo puede reducirse a temperaturas bajas. Los mejores resultados se obtienen trabajando entre 15 y 25°C.
2. Mantener la microplaca alejada de fuentes de vibración, calor y luz solar directa.
3. El modelo de aglutinación de las Células Control no debe tomarse como referencia para la interpretación de resultados negativos, ya que éstas producen botones más compactos que con las Células Test.
4. Para eliminar los anticuerpos específicos de la muestra proceder de la siguiente manera: Mezclar 10 µL de la muestra con 190 µL de Células Control (R2). Mezclar e incubar 30 minutos. Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 3 minutos. Separar el sobrenadante y ensayarlo como muestra sin la dilución previa 1:20.
5. Las muestras con niveles elevados de anticuerpos anti-*T. pallidum* pueden presentar modelos de aglutinación con los bordes replegados, que pueden inducir a una interpretación errónea y ser calificados como resultados negativos.
6. No leer los resultados pasados 60 min.

CAUSAS DE ERROR

- La contaminación bacteriana de controles y muestras, así como la congelación y descongelación del reactivo, son causas generales de resultados positivos falsos.
- El Reactivo TPHA no debe utilizarse con posterioridad a su fecha de caducidad, puesto que un almacenamiento más prolongado puede afectar su sensibilidad.
- La reutilización de las placas microtiter pueden causar resultados erróneos.

REFERENCIAS

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 PJL. 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, 4th ed. AAC Press (1995).

