

TPHA

200 Teste

Numai pentru diagnostic in vitro

Determinare prin hemaglutinare pe microplaci a anticorpilor anti-Treponema Pallidum

PRINCIPIUL

TPHA (Treponema Pallidum HemAgglutinare) este un test specific de hemaglutinare pentru detectia cantitativa si semi-cantitativa a anticorpilor anti-Treponema pallidum in serul uman. Prin tratarea unor eritrocite stabilizate de pasare, sensibilizate cu solutie antigen Treponema pallidum , aglutinate in prezenta anticorpilor anti-Treponema pallidum se acorda acestora o structura caracteristica.

CONSTITUENTI SI COMPOZITIE

- **R1** Celule test in suspensie. Eritrocite stabilizate de pasare imbracate cu *Treponema pallidum* antigen, pH de 7.2. Contine 0.95 g/l azida de sodiu. **R1** – 2 x 8.5 ml.
- **R2** Celule control in suspensie. Eritrocite stabilizate de pasare neimbracate cu *Treponema pallidum* antigen, pH de 7.2. Contine 0.95 g/l azida de sodiu. **R2** – 2 x 8.5 ml.
- **R3** Diluent. Tampon - solutie salina, pH 7.2. Contine 0.95 g/l azida de sodiu. **R3** – 2 x 20 ml.
- 1x 0.5 ml Control Pozitiv. Ser imun uman. Contine 0.95 g/l azida de sodiu.
- 1x 0.5 ml Control Negativ. Ser animal. Contine 0.95 g/l azida de sodiu.

Precautie : Diferite componente de origine umana diferita au fost testate si diagnosticate negativ pentru prezenta de anticorpi Anti-HIV 1+2, Anti-HCV si de asemenea HbsAg. Continutul flacoanelor de control trebuie utilizat cu grija, la fel ca unele seruri potential infectate. Reactivii acestui kit contin azida de sodiu. Evitati contactul acestora cu pielea sau mucoasele.

CONSERVARE SI STABILITATE

Reactivii si controalele sunt stabile pana la data expirarii indicata pe eticheta.

Conservare la 2-8 ° C, a nu se congela. Reactivul pre-congelat poate influenta functionalitatea testului.

REACTIVUL SI PROBA DE LUCRU

Reactivii, Controlul Negativ si Pozitiv sunt gata preparati.

Proba : Ser. Serul poate fi conservat la - 2-8 ° C timp de 7 zile sau la (- 20 ° C) pentru conservarea pe termen mai lung.

MATERIALE NECESARE

- Pipete automate.
- Microplaci 96 godeuri format " U".

PROCEDURA ANALITICA

Metoda calitativa

1. Aduceti reactivul si proba la temperatura camerei (Vezi Nota 1).
2. Agitati usor flacoanele de reactivi **R1** si **R2** pentru a resuspenda reactivul.
3. Diluati serul si controalele cu diluent in proportie de 1:20 (50 µl serum + 950 µl diluent).
4. Pipetati in 3 godeuri succesive ale microplacii :

Ser sau Controale 1:20 (µl)	25	25
R2	75	-
R1	-	75
5. Agitati placa usor pentru mixare.
6. Acoperiti microplaca si incubati la temperatura camerei timp de 45-60 minute (Vezi Nota 2).
7. Observati macroscopic modelele de aglutinare a celulelor.

INTERPRETAREA REZULTATELOR

Interpretati rezultatele comparand modelele de aglutinare cu modele prezentate de Celule test cu Celule control (Vezi Nota 3). Citirea se Interpreteaza conform urmatoarelor criterii:

Gradul de Hemaglutinare	Citirea	Rezultatul
Celule aglutinate ce acopera in intregime baza godeului cu margini rasfrante	4 +	Reactiv
Celule aglutinate ce acopera partial baza godeului	3 +	Reactiv
Celule aglutinate inconjurate de un cerc rosu	2 +	Reactiv
Celule aglutinate pe suprafata foarte mica inconjurate de un mic cerc rosu	1 +	Reactiv
Buton de celule ce include un gol (orificiu)	±	Nedeterminat*
Buton compact, bine definit de celule, rar prezentand mici goluri (orificii)	-	Negativ

Oricare model de aglutinare prezentat de Celulele control indica prezenta de anticorpi non-specifici si nu poate fi interpretata. Probele nedeterminate trebuie retestate si catalogate ca fiind negative in cazul in care prezinta acelasi model de hemaglutinare. Probele reactive trebuie titrate urmand Metoda Semi-Cantitativa.

* Limita intre Reactiv si Negativ.

Metoda Semi – Cantitativa.

1. Pregatiti doua dilutii successive ale unei predilutii de 1:20 proba : diluent.
2. Testati fiecare dilutie conform gradului de hemaglutinare.

Interpretare

Titrul probei se considera a fi cea mai mare dilutie care prezinta reactivitate. Urmatoarele dilutii mai mari trebuie sa fie negative.

CONTROL CALITATIV

Controlul negativ si pozitiv trebuie efectuat zilnic pentru a fi verificata reactivitatea optima a Reactivului. Controlul negativ nu trebuie sa prezinte nici un fel de model de aglutinare cu Celulele Test si Celulele Control. Controlul pozitiv trebuie sa prezinte doar modele de aglutinare cu Celulele Test.

SEMNFICATIE CLINICA

Sifilisul, cauzat de *Treponema pallidum*, este o infectie cronica cu variate manifestari clinice ce apar in diferite etape. Anticorpii anti- *Treponema pallidum* apar in prima faza si pot sa persiste in cazul a 85-90% din pacientii tratati dupa ce acestia au fost tratati si vindecati. Din moment ce aceasta patologie in mod fregvent nu se manifesta in nici un fel si perioada contagioasa este prelungita, este foarte important sa fie folosite teste serologice, specifice pentru detectarea infectiei, cu o specificitate crescuta.

PERFORMANTE ANALITICE

Sensibilitate : sensibilitatea reactivului este calibrata conform Primului Standard International de Ser Sifilitic (WHO).

Efectul prozona : nu a fost detectat efectul prozona pana in valori ale titrului > = 1 / 163840 (Vezi Nota 4).

Sensibilitatea Diagnosticului : 99,4%

Specificitatea Diagnosticului :100%

Rezultatele obtinute cu acest reactiv nu au aratat diferente semnificative in comparatie cu reactivi de referinta. Detalii ale acestui experiment comparativ pot fi prezentate la cerere.

Urmatoarele substante: bilirubina (<20mg/dL), hemoglobina (<10g/L), lipide (<10g/L) si factorii reumatoizi (<300 IU/mL) nu interfera cu rezultatul testarii. Alte substante pot intervenii (Vezi Referinte 7).

LIMITELE METODEI

Metoda **TPHA** (*Treponema Pallidum HemAgglutinare*) nu poate distinge anticorpii de tip anti-*Treponema pallidum* de anticorpii ce aparțin de alte treponeme patogene (ex. *T. pertenue* și *T. carateum*). Este de preferat ca toate rezultatele pozitive să fie confirmate de metoda alternativă FTA-Abs.

Rezultatele fals pozitive pot să apară în infecții cu mononucleoză infecțioasă, lepra, borreliosis, boli autoimune și a consumul de narcotice.

Rezultate fals negative pot să apară în infecții primare recente sau în cazul ultimelor stadii latente ale bolii.

Metoda **TPHA** (*Treponema Pallidum HemAgglutinare*) nu este concludentă în determinarea eficacității tratamentului deoarece nivelul de anticorpi se menține un timp îndelungat după aplicarea tratamentului clinic și astfel testul rămâne pozitiv.

NOTA

1. Sensibilitatea testului poate fi redusă la temperaturi joase. Rezultate corecte ale testului se obțin în cazul aducerii reactivului la temperatura optimă de lucru - intervalul de temperatură 15-25° C.

2. Microplacile trebuie ferite de căldură, lumină și vibrații.

3. Modelele de aglutinare prezentate de Celule Control nu trebuie utilizate ca modele de referință pentru rezultate negative, deoarece Celulele Control prezintă mai mulți butoni compacți de celule față de Celulele Test.

4. Serul ce conține un nivel înalt de anticorpi poate prezenta modele de aglutinare cu margini răsfrante.

SURSE DE ERORI

- Contaminarea bacteriană a controalelor și a probelor
- Congelarea reactivului
- Trusa de TPHA nu trebuie utilizată în afara termenului de valabilitate deoarece o înmagazinare prelungită poate afecta sensibilitatea Celulelor Test.

REFERINTE

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 (1967).
6. Young D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 4th Edition. AACC Press (1995).