



**BIOLABO**  
www.biolabo.fr

**FABRICANTE:**  
**BIOLABO SAS,**  
Les Hautes Rives  
02160. Maizv. France

# TPHA

Test de hemaglutinación para la determinación cualitativa y semicuantitativa de los anticuerpos de *Treponema pallidum* en suero o plasma humano.

REF 4500100 : 100 tests	R1 20 mL	R2 7,5 mL	R3 7,5 mL	R4 1,0 mL	R5 1,0 mL
REF 4500200 : 200 tests	R1 2 x 20 mL	R2 2 x 7,5 mL	R3 2 x 7,5 mL	R4 1 x 1,0 mL	R5 1 x 1,0 mL

## SOPORTE TECNICO Y PEDIDOS

Tel : (33) 03 23 25 15 50



**IVD** USO IN VITRO

Fax : (33) 03 23 256 256

## SIGNIFICACION CLINICA (1) (2)

La Sífilis es una enfermedad venérea causada por un microorganismo spirochaete *Treponema pallidum*. Este microorganismo no puede ser cultivado en medio artificial, por lo que el diagnóstico de la sífilis se basa sobre la correlación de los datos clínicos y la detección de anticuerpos específicos por tests serológicos. Los tests de detección de la sífilis utilizan la cardiolipina asociada a la lecitina como antígeno. Son tests simples de emplear pero los falsos positivos son frecuentes debido a la naturaleza no treponémica de los antígenos.

Los tests TPI (*Treponema pallidum* Inmovilización) y FTA-ABS (Fluorescent *Treponema* Assay) utilizan el *Treponema pallidum* patógeno como antígeno pero presentan algunas desventajas para los tests de rutina. El test TPI necesita utilizar *T. pallidum* patógeno vivo y el test FTA-ABS requiere la utilización de un microscopio de fluorescencia así como un nivel elevado de competencia.

El test TPHA es reconocido por su comodidad de utilización y su especificidad para el diagnóstico de las infecciones treponémicas. Su especificidad es comparable a la del test TPI y su sensibilidad próxima a la del test FTA-ABS. Solamente necesita un mínimo de instrumentos de laboratorio y es muy simple de realizar.

## PRINCIPIO

El test TPHA es un test de hemaglutinación indirecto (IHA) para la determinación de anticuerpos de *T. pallidum* en el suero/plasma humano. Eritrocitos aviarios estabilizados son sensibilizados por componentes antigénicos de *T. pallidum* patógeno (cepa de Nichol). Células « test » aglutinan en presencia de anticuerpos específicos de *T. pallidum* y forman una imagen (velo) característico en los pozos de una placa de microtitración. Toda reacción no específica se detecta por la utilización de las células « Control » que son eritrocitos aviarios no sensibilizados. Los anticuerpos de treponema no patógenos son adsorbidos por un extracto de treponemas de Reiter, incluido en la suspensión de células Test. El resultado del test se obtiene en 45-60 minutos y el velo característico de la aglutinación celular es fácilmente legible y persistente.

## REACTIVOS

- Vial R1** **Tampón de dilución**  
Diluyente para la predilución de las muestras
- Vial R2** **Suspensión de células Test**  
Eritrocitos aviarios estabilizados sensibilizados con el antígeno de *T. pallidum*.
- Vial R3** **Suspensión de células Control**  
Eritrocitos aviarios estabilizados.
- Vial R4** **Suero de control Positivo (prediluido al 1/20)**  
Suero humano que contiene anticuerpos contra *T. pallidum*.  
Listo para el uso. El test cuantitativo da un resultado equivalente a un título de 1/640 a 1/2560.
- Vial R5** **Suero de control Negativo (prediluido al 1/20)**  
Suero humano exento de anticuerpos contra *T. pallidum*.

## PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Los reactivos están listos para el uso.

## REACTIVOS Y MATERIAL COMPLEMENTARIOS

1. Pipeta de precisión adecuada para distribuir 10, 25, 75, 190 µL.
2. Placa de microtitración con fondo en U.

## ESTABILIDAD Y CONSERVACION

### Almacenar a 2-8°C protegido de la luz

- En ausencia de contaminación, almacenada en el vial de origen y utilizada como se indica en las instrucciones de uso, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja.
- Los viales que contienen los reactivos deben ser almacenados de pie.
- Rechazar cualquier reactivo contaminado o que no dé resultados correctos con los sueros de control.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Los reactivos contenidos en cada caja han sido estandarizados para producir la reacción esperada y no deben ser intercambiados con otros lotes.

## PRECAUCIONES

Los reactivos BIOLABO están destinados a personal cualificado, para uso in vitro.

- Verificar la integridad de los reactivos antes de su utilización.
- Utilizar equipos de protección (bata, guantes, gafas).
- No pipetear con la boca.
- En caso de contacto con la piel o los ojos, enjuagar abundantemente y consultar con un médico.
- Los reactivos contienen azida de sodio (concentración < 0,1%) que puede reaccionar con metales como el cobre o el plomo de las tuberías. Enjuagar con abundante agua.
- Los controles se realizan a base de sueros humanos. Cada suero humano utilizado en la fabricación de los controles ha sido analizado y ha dado resultados negativos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), los anticuerpos de la hepatitis C (anti-HCV) y del VIH 1 y VIH 2. Sin embargo como ningún test puede garantizar de forma absoluta la ausencia de cualquier agente infeccioso, tratar este producto como potencialmente infeccioso.
- Para más información, la ficha de datos de seguridad se puede obtener por petición.
- **Eliminación de los deshechos:** respetar la legislación en vigor. Los accesorios reutilizables deben ser esterilizados por un método apropiado después de su utilización. Los accesorios de uso único deben ser considerados como deshechos potencialmente infecciosos e incinerados o autoclavados. Vertidos accidentales de material potencialmente infeccioso deben ser eliminados y tratados como indicado aquí abajo. La superficie potencialmente contaminada debe ser desinfectada con un desinfectante o alcohol a 70%.

Por medida de seguridad, tratar toda muestra como potencialmente infecciosa, en el respeto de las buenas prácticas de laboratorio. Respetar la legislación en vigor.

## TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA

**Suero:** Tomar una muestra de sangre de paciente y dejar coagular. Centrifugar la sangre coagulada y separar el suero. Trabajar de forma imperativa sobre suero recién extraído.

**Plasma:** Tomar una muestra de sangre de paciente en un vial de colecta de plasma. Centrifugar la muestra y separar el plasma. Trabajar de forma imperativa sobre suero recién extraído.

No utilizar suero o plasma hemolizado, contaminado o lipémico que sean susceptibles de interferir con el test.

El suero se puede conservar a 2-8°C por lo menos durante 7 días. Para un tiempo prolongado, almacenar a -20°C (una vez solamente). Homogeneizar las muestras congeladas antes de utilizar.

## INTERFERENCIAS

Los anticuerpos desarrollados en una Sífilis pueden persistir después de la curación. Es la razón por la cual el test TPHA positivo puede indicar una infección presente o pasada.

Al igual que otros tests de serodiagnóstico el test TPHA no permite distinguir la sífilis de otras infecciones treponémicas (ej. pian).

Los signos clínicos se deben tomar en consideración.

Aunque el test TPHA sea muy específico, resultados falsamente positivos han sido constatados en pacientes que sufren de la lepra, mononucleosis infecciosa y turbias de tejido conjuntivo.

El test FTA-ABS permite la diferenciación entre las IgG y las IgM más precoces y puede ser entonces utilizado para confirmar el test TPHA. Este test es también muy útil en el caso de Sífilis muy precoz donde el test de hemaglutinación puede dar resultados negativos.

## CONTROL DE CALIDAD

Controles positivos y negativos incluidos en la caja.  
Programa externo de control de calidad.

Se recomienda controlar en los siguientes casos:

- Al menos un control por rutina.
- Al menos un control cada 24 horas.
- Cambio de vial del reactivo.

Cuando los resultados del control son incorrectos, aplicar las siguientes acciones:

1. Repetir la operación utilizando el mismo control.
2. Si los resultados siguen incorrectos, utilizar otro vial de control y repetir el test.
3. Si los resultados siguen incorrectos, utilizar otro vial de reactivo y repetir el test.
4. Si los resultados siguen incorrectos, contactar el servicio técnico BIOLABO o el distribuidor local.

## PRESTACIONES

**Especificidad:** Dos estudios independientes sobre 2900 sueros de donantes pertenecientes a una población de bajo riesgo han mostrado cada uno 100% de consenso con métodos pre-existentes. La tasa de reactividad inicial siendo del 0,1% y la tasa de reactividad repetida siendo del 0%.

Un estudio independiente sobre suero prenatal muestra 100% de especificidad (con 95% de confianza, 98,04%-100%).

**Sensibilidad:** Un estudio interno realizado sobre 110 muestras determinadas como positivas dan el 100% de resultados positivos (con el 95% de confianza, 98,04-100%)

## MODO DE EMPLEO (TECNICA MANUAL)

### METODO CUALITATIVO

Prever 3 pozos de la placa de microtitración por muestra.

1. Poner cada uno de los componentes a temperatura ambiente.
2. Añadir 190 µL de diluyente en el pozo 1.
3. Añadir 10 µL de suero en el pozo 1.
4. Con la ayuda de una micropipeta, mezclar el contenido del pozo 1 y transferir 25 µL de esta dilución 1/20 en los pozos 2 y 3.
5. Poner en suspensión por inversiones las células Test y Control.
6. Añadir 75 µL de células Control en el pozo 2.
7. Añadir 75 µL de células Test en el pozo 3.
8. Homogeneizar mecánicamente o manualmente el contenido de los pozos.
9. Cubrir la placa y situarla protegida de la luz, del calor y de cualquier fuente de vibración.
10. Incubar 45-60 minutos a temperatura ambiente. Leer los resultados.
11. Los resultados son estables 24 horas si la placa esta cubierta y si las precauciones aquí arriba son respetadas.
12. Al fin del test, tirar las placas utilizadas (ver § Precauciones).

### METODO SEMICUANTITATIVO

Prever 8 pozos de la placa de microtitración por muestra. Identificarlas de A a H.

1. Distribuir 25 µL de diluyente (vial R1) de los pozos B a H incluidos.
2. Transferir 25 µL de suero diluido 1/20 del test de detección en los pozos A y B. Mezclar bien el contenido del pozo B.
3. Tomar 25 µL de suero diluido del pozo B y diluir en alícuotas de 25 µL de forma repetida de los pozos B a H incluidos, rechazando 25 µL de la dilución del pozo H.
4. Asegurarse que las células test están bien puestas en suspensión. Añadir 75 µL de células test de los pozos A a H incluidos. Esto conduce a una dilución 1/80 en el pozo A hasta 1/10240 en el pozo H.
5. Homogeneizar mecánicamente o manualmente el contenido de los pozos.
6. Cubrir la placa y situarla protegida de la luz, del calor y de cualquier fuente de vibración.
7. Incubar 45-60 minutos a temperatura ambiente. Leer los resultados.
8. Los resultados son estables 24 horas si la placa está cubierta y si las precauciones aquí arriba son respetadas.
9. Al fin del test, tirar las placas utilizadas (ver § Precauciones).

## INTERPRETACIONES DE LOS RESULTADOS

### Método cualitativo

RESULTADOS	CELULAS TEST	CELULAS CONTROL
Fuertemente Positivo	Velo de células cubriendo la totalidad del fondo del pozo.	No hay aglutinación, botón compacto
Ligeramente Positivo	Velo de células cubriendo aproximadamente 1/3 del fondo del pozo.	No hay aglutinación, botón compacto
Indeterminado	Velo de células con un agujero central bien visible	No hay aglutinación, botón compacto
Negativo	Células compactadas en un botón central, habitualmente con un pequeño centro claro.	No hay aglutinación, botón compacto
No específica *	Reacción Positiva	Reacción Positiva

### Método cuantitativo:



Negativo 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560 1/5120

El título corresponde a la más fuerte dilución que conduce a una aglutinación.

Cualquier muestra que da una aglutinación inferior a "+/-" es negativa. Cualquier muestra que da una aglutinación superior a "+/-" debe ser considerada de forma provisoria como positiva. Se debe repetir el test en duplicado, añadiendo las células Control en la primera serie de pozos y las células test en la otra serie.

Si la aglutinación en la serie de células test es más fuerte que en la serie de células Control, la muestra contiene anticuerpos antitreponémicos y será sometida a otros tests de confirmación.

Si la aglutinación en la serie de células Control es superior o igual a la de serie de células test, el modo de empleo aquí abajo para adsorción no específica debe aplicarse.

### « Modo de empleo en caso de adsorción no específica »:

1. Transferir 100 µL de suero para testar en un pequeño tubo y añadir 400 µL de células Control. Mezclar bien y dejar incubar una hora.
2. Centrifugar 15 minutos a 1000 rpm y testar el sobrenadante con el método cualitativo.

Nota: La muestra es así diluida al 1/5, esto debe ser tomado en consideración para preparar las diluciones. Si el resultado es de nuevo no específico, repetir el test con otro método: ej. Reagina o FTA-ABS.

### Interpretaciones de los resultados:

Reacciones fuertemente positivas pueden conducir a unos pliegues en el borde del velo celular.

Cuando el pozo Test es positivo, también se debe observar el pozo Control. Las células Control se aglutinan en un botón compacto. No deben servir en ningún caso de referencia tal como imagen de no reactividad porque las células Control aparecen bajo la forma de un botón más compacto que las células Test no reactivas.

Una aglutinación en el pozo de control indica la presencia de aglutininas no específicas en la muestra, tal resultado debe considerarse como **NO VALIDO**.

Un suero que da este tipo de resultado debe ser adsorbido utilizando las células Control como indicado en el « Procedimiento en caso de adsorción no específico ». Una reacción dudosa con las células Test se considera como **INDETERMINADA**. Este resultado puede corresponder a un principio de Sífilis primaria o a un viraje. Estas muestras deben ser testadas en un primer tiempo de nuevo con el método cualitativo y posteriormente para verificar si el título aumenta o no. También se recomienda realizar un test de confirmación Reagina y/o otro test (FTA-ABS) para completar la tabla diagnóstica.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum* WHO/VDTR/RES 1965 ; 77 : 65.
- (2) Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308, 1966.
- (3) Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5
- (4) Tomizawa T, Kasamatsu S, Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969 ; 22 : 341-50.
- (5) Sequeira P,J,L, Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973 ; 49 : 242-8.
- (6) Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981 ; 14 : 441 - 445.
- (7) Paris Hamelin, A., Dreux P. et coll. - Tréponématoses : aspects cliniques et biologiques. Feuille. Biol. 1991a ; 23 : 88-89.
- (8) Houg H. - Syphilis : new diagnostic directions. Intern. J. STD and AIDS 1992 ; 3 : 391-413.
- (9) Sluis J.J. Van Der. - Laboratory Techniques in the diagnosis of syphilis : a review. Genitourin Med. 1992 ; 68 : 413-9.
- (10) Dague G.L. - Diagnostic Biologique de la Syphilis. Technique et Biologie, 1995 ; 120 : 5-30.
- (11) North ML et Guntz Ph. Sérodiagnostic de la syphilis. La Revue Française des Laboratoires, 1997 ; 294 : 51-58