

TPHA MonlabTest®



Determinación cualitativa de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2 - 8°C.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

SIGNIFICADO CLÍNICO

La sífilis es una enfermedad venérea provocada por la infección con *T. pallidum*. La transmisión del microorganismo se produce por contacto directo a través de una lesión productiva. El periodo de incubación es aproximadamente de 20 días y la enfermedad progresa a través de 3 fases distintas con sintomatología diferente. 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.

REACTIVOS

| | |
|---------------------------------|--|
| R1: Células Test (TC) | Hematíes de ave estabilizados y sensibilizados con antígenos de <i>T. pallidum</i> (Nichols), Conservante. pH 7,2. |
| R2: Células Control (CC) | Suspensión estabilizada de hematíes de ave, Conservante. pH 7,2. |
| R3: Diluyente (DIL) | Tampón fosfato, extracto de <i>T. pallidum</i> (Reiter), Conservante. pH 7,2 |
| Control + | Suero inmune humano prediluido 1:20. Conservante. |
| Control - | Suero de animal, Conservante. |

PRECAUCIONES

Todos los componentes de origen humano han resultado ser negativos para el antígeno HBs, HCV y para el anti-HIV (1/2). Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CALIBRACIÓN

La sensibilidad del reactivo es trazable al 1º Patrón Internacional de Sífilis de OMS.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No congelar: la congelación de los reactivos altera irreversiblemente la funcionalidad de éstos.

Conservar los viales de las Células Test y Control siempre en posición vertical. La conservación en posición horizontal puede ocasionar la aparición de agregados celulares. En caso de cambio de posición agitar hasta la disolución de posibles agregados.

Indicadores de deterioro de los reactivos: Presencia de partículas agregadas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Placas de microtitulación con fondo en "U".
- Pipetas de 25-75 µL.

MUESTRAS

Suero fresco o plasma. Estable 8 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas antes del usar. No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

Método cualitativo

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Preparar una dilución 1:20 de la muestra en Diluyente (10 µL suero + 190 µL Diluyente).
3. Pipetear en pocillos adyacentes de una placa de microtitulación^(Nota 1):

| | | |
|-------------------------------|----|----|
| Muestra 1/20 o Controles (µL) | 25 | 25 |
| Células Control (µL) | 75 | -- |
| Células Test (µL) | -- | 75 |

4. Agitar suavemente la placa hasta la completa homogenización de las mezclas.
5. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 45-60 minutos.^(Nota 2)
6. Examinar macroscópicamente los patrones de aglutinación de las células.

Método semi-cuantitativo

1. Realizar diluciones dobles a partir de la dilución 1:20 de la muestra en Diluyente.
2. Ensayar cada dilución como se describe en el método cualitativo.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Los resultados deben ser leídos comparando los patrones 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 replegados | 4+ | Reactivo |
| Capa de células cubriendo parte del fondo del pocillo | 3+ | Reactivo |
| Capa de células 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 |

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.

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

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

Las muestras positivas deben ser tituladas según el procedimiento semicuantitativo. Se define el título como la dilución mayor que da resultado reactivo.

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.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar el control positivo y negativo para controlar la funcionalidad del reactivo, así como modelo de comparación para la interpretación de los resultados.

Todo resultado distinto al resultado que da el control negativo se considerará positivo.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

1. **Sensibilidad analítica:** 0,1 IU/mL frente al 1r Patrón Internacional de plasma sifilítica humana IgG e IgM de NIBSC 05/132.
2. **Efecto prozona:** No se observa efecto prozona hasta títulos $\geq 1/163840$.
3. **Sensibilidad diagnóstica:** 100 %
4. **Especificidad diagnóstica:** 100 %.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (20 mg/L), hemoglobina (10 g/L), lípidos (10 g/L) y factores reumatoides (300 UI/mL), no interfieren. Otras sustancias pueden interferir⁴.

NOTAS

1. Mezclar vigorosamente o con el agitador vortex los viales de Células Test y Control inmediatamente antes de usar.
2. Mantener la microplaca alejada de fuentes de vibración, calor y luz solar directa.
3. El patrón de aglutinación de las Células Control no debe tomarse como modelo para la interpretación de resultados negativos, ya éstas producen botones más compactos que con las Células Test.
4. Los sueros con elevado título de anticuerpos pueden mostrar patrones de aglutinación con los bordes muy replegados.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

- El ensayo de TPHA presenta determinadas inespecificidades con anticuerpos de otras especies de treponemas patógenos. Es recomendable que todos los resultados positivos se confirmen con técnicas alternativas como FTA-Abs.
- Se han descrito reacciones falsamente positivas en muestras de pacientes con mononucleosis, lepra, borreliosis, enfermedades autoinmunes y drogadicción.
- 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.

BIBLIOGRAFÍA

1. Larsen S.A. et al., Clin.Microbiol.Rev., 1995.
2. M.Janier et al., European Guideline on the Management of Syphilis, 2014.
3. Ratnam S. et al., Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACC Press, 1995

PRESENTACIÓN

| | |
|---------------------|---|
| MO-165024 100 tests | Células Test (TC): 1 x 7,5 mL Células Control (CC): 1 x 7,5 mL Diluyente (DIL): 2 x 10 mL Control +: 1 x 1 mL Control -: 1 x 1 mL |
|---------------------|---|

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

| | | | |
|--|-----------------------------------|--|------------------------------------|
| | Fabricante | | Uso de diagnóstico <i>in vitro</i> |
| | No reutilizar | | Consultar las instrucciones de uso |
| | Contiene suficiente para <n> test | | Mantener seco |
| | Código | | Límite de temperatura |
| | Número de lote | | Fecha de caducidad |



TPHA MonlabTest®



Qualitative determination of anti-*Treponema pallidum* antibodies

Only for professional *in vitro* diagnostic use. Store at 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The TPHA MonlabTest (*Treponema Pallidum* Hemagglutination) is an indirect hemagglutination test for the qualitative and semi-quantitative detection of specific anti-*T. pallidum* antibodies in human serum. Stabilized avian erythrocytes sensitised with an antigenic *T. pallidum* solution, agglutinates in the presence of anti-*T. pallidum* antibodies to give a characteristic pattern.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Syphilis is a venereal disease caused by *T. pallidum* infection. *T. pallidum* transmission occurs by direct contact with a productive lesion. The incubation period is about 20 days and the disease progress through 3 different stages with different symptomatology. The anti-*T. pallidum* antibodies appears in the first stage and may persist in the 85-90% of treated patients after they have been treated and cured.

REAGENTS

| | |
|-------------------------------|--|
| R1: Test Cells (TC) | Stabilized avian erythrocytes sensitised with <i>T. pallidum</i> (Nichols) antigens, Preservative, pH 7.2. |
| R2: Control Cells (CC) | Stabilized suspension of avian erythrocytes, Preservative, pH 7.2. |
| R3: Diluent (DIL) | Phosphate buffered saline, pH 7.2, <i>T. pallidum</i> (Reiter) extract, Preservative. |
| Control + | Immune human serum prediluted 1:20. Preservative |
| Control - | Animal serum, Preservative |

PRECAUTIONS

Components from human origin have been tested and found to be negative for the presence of HBsAg, HCV, and antibody to HIV (1/2). However, handle cautiously as potentially infectious.

CALIBRATION

The reagent sensitivity is calibrated against the 1st International Standard for Syphilitic serum (WHO).

STORAGE AND STABILITY

All the kit components will remain stable until the expiration date printed on the label, when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not freeze, frozen reagents could change the functionality of the test. Store the vials in vertical position. Horizontal position may cause cellular clusters. If the position is changed, gently mix to dissolve aggregates that may be present.
Reagents deterioration: Presence of clusters, particles and turbidity.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- U-well microtitration plates.
- Pipettes 25-75 µL.

SAMPLES

Fresh serum or plasma. Stable 8 days at 2-8°C or 3 months at -20°C. The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing. Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

Qualitative method

1. Allow the reagents and sample to reach room temperature.
2. Dilute serum 1:20 with Diluent (10 µL serum + 190 µL Diluent)
3. Pipette into adjacent wells of a microtitration plate (Note 1):

| | | |
|------------------------------|----|----|
| Sample 1:20 or Controls (µL) | 25 | 25 |
| Control Cells (µL) | 75 | -- |
| Test Cells (µL) | -- | 75 |

4. Mix thoroughly the microplate till the complete homogenisation of the mixing reaction.
5. Cover the microplate and incubate at room temperature for 45-60 minutes (Note 2).
6. Examine macroscopically the agglutination patterns of the cells.

Semi-quantitative method

1. Make two fold dilutions of the predilute 1:20 sample in Diluent.
2. Test each dilution as described in the qualitative method.

READING AND INTERPRETATION

Read the results by comparing the agglutination patterns of the Test Cells with the Control Cells (Note 3). Readings are scored and reported according to the following criteria:

| Degree of hemagglutination | Reading | Result |
|---|---------|------------|
| Smooth mat of cells covering entire well bottom, sometimes with folded edges | 4+ | Reactive |
| Smooth mat of cells covering part of the well bottom | 3+ | Reactive |
| Smooth mat of cells surrounded by a red circle | 2+ | Reactive |
| Smooth mat of cells covering less area and surrounded by a smaller red circle | 1+ | Reactive |
| Button of cells having a small hole in centre | ± | Borderline |
| Definite compact button of cells, sometimes with a very small hole in the centre. | - | Negative |

The Negative Control should not show any agglutination pattern with both Test Cells and Control Cells.

The Positive Control should only show agglutination patterns with Test Cells.

Any agglutination pattern showed by Control Cells indicates the presence of non-specific antibodies and cannot be interpreted. Samples with a borderline pattern should be retested and reported as negatives if the same pattern is reproduced. Reactive samples should be titered following the semi-quantitative method. The serum titer is defined as the highest dilution showing reactive result.

Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result but should integrate both clinical and laboratory data.

QUALITY CONTROL

Positive and Negative controls are recommended to monitor the performance of procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation. All result different from the negative control result, will be considered as a positive.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Analytical sensitivity:** 0,1 IU/mL against the 1st International Standard for human syphilitic plasma IgG and IgM NIBSC 05/132.
2. **Prozone effect:** No prozone effect was detected up to titers ≥ 1/163840.
3. **Diagnostic sensitivity:** 100 %
4. **Diagnostic specificity:** 100 %

INTERFERENCES

Bilirubin (20 mg/dL), hemoglobin (10 g/L), lipids (10 g/L) and rheumatoid factors (300 IU/mL), do not interfere. Other substances may interfere⁴.

NOTES

1. Mix vigorously or on a vortex mixer the vials of both Test and Control Cells immediately before use.
2. Keep the microplate away from the vibrations, heat and direct sunlight.
3. The agglutination pattern of the Control Cells should not be used as a reference for negative results since Control Cells give more compact button than do the Test Cells.
4. Sera with a high level of antibodies may give agglutination patterns with very folded edges.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The TPHA test cannot discriminate antibodies anti-*T. pallidum* from antibodies to other pathogenic treponemas. It is recommended that all positive results be confirmed by alternative procedures as FTA-Abs.
- False positive results have been described with samples of patients with mononucleosis, leprosy, borreliosis, autoimmune diseases and drug addiction.
- The TPHA test is not useful in determining the effectiveness of the therapy, since the antibodies level remains long time after the disease has been clinically cured and the test remains positive.

BIBLIOGRAPHY

1. Larsen S.A. et al., Clin.Microbiol.Rev., 1995.
2. M.Janier et al., European Guideline on the Management of Syphilis, 2014.
3. Ratnam S. et al., Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AAC Press, 1995.

PACKAGING

| | |
|---------------------|---|
| MO-165024 100 tests | Test Cells (TC): 1 x 7.5 mL Control Cells (CC): 1 x 7.5 mL Diluent (DIL): 2 x 10 mL Control +: 1 x 1 mL Control -: 1 x 1 mL |
|---------------------|---|

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

| | | | |
|--|-----------------------------------|--|---|
| | Manufacturer | | For <i>in vitro</i> diagnostic use only |
| | Don't re-use | | Consult instructions for use |
| | Contains sufficient for <n> tests | | Keep dry |
| | Catalogue Code | | Temperature limitation |
| | Lot Number | | Use by |

