

TPHA. Hemoaglutinación en microplaca Ref.: KTPH-100

Reactivos para la determinación de TPHA
Solo para uso in vitro en el laboratorio clínico
Conservar a 2-8°C

100 determinaciones

TPHA



PRINCIPIO DEL METODO

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 anticuerpos específicos frente a *T. pallidum* causan la aglutinación de los eritrocitos de gallina estabilizados y sensibilizados con un extracto de antígenos de *T. pallidum*.

SIGNIFICADO CLINICO

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 Sensibilizadas (SC) Hematíes de ave estabilizados y sensibilizados con antígenos de *T. pallidum* (Nichols), NaN₃ 0,95 g/L, pH, 7,2.

R2: Células Control (CC) Suspensión estabilizada de hematíes de ave, NaN₃ 0,95 g/L, pH, 7,2.

R3: Diluyente (DIL) Tampón fosfato, extracto de *T. pallidum* (Reiter), NaN₃ 0,95 g/L, pH 7,2.

Control + Suero inmune humano prediluido 1:20. NaN₃, 0,95 g/L.

Control - Suero de conejo, NaN₃, 0,95 g/L.

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.

CONSERVACION 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.

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

MATERIAL ADICIONAL

- Placas de microtitulación con fondo en "U".

MUESTRAS

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

Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas antes de 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 (50 µL suero + 950 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 min. (Nota 2).
6. Examinar macroscópicamente los patrones de aglutinación de las células.

Método semicuantitativo

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.

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.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Sensibilidad analítica: se corresponde con la observada utilizando el 1º Patrón Internacional de Sífilis de OMS.

Efecto prozona: No se observa efecto prozona hasta títulos $\geq 1/163840$ (Nota 4).

Sensibilidad diagnóstica: 99,5 %. **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 interferir⁵.

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.

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.

NOTAS

1. Agitar vigorosamente 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Paris hamelin et al. Feuillets de Biologie 1983; 24(133): 35-42.
2. Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1966; 19: 305-308.
3. Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1969; 22: 341.
4. Sandra A Larsen et al. A manual of Test for Syphilis American Public Health Association 1990: 1-192.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACC Press, 1995.