

Test quantitativo dell'anticorpo anti-Treponema Metodo in emoagglutinazione passiva

PRINCIPIO

Il TPHA (treponema pallidum hemoagglutination) è un test di emoagglutinazione indiretta per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di anticorpi specifici verso il T. pallidum nel siero umano. Emazie di pollo sensibilizzate con soluzione antigenica di T. pallidum agglutinano in presenza di anticorpi anti treponema pallidum per dare un caratteristico pattern.

SIGNIFICATO CLINICO

La sifilide è una malattia venerea causata dalla infezione da treponema Pallidum. L'infezione avviene per contatto diretto con lesioni aperte. Il periodo di incubazione è di circa 20 giorni e la malattia progredisce in the differenti stadi con differenti sintomatologie. Gli anticorpi anti T. pallidum compaiono nel primo stadio e possono persistere nell'85-90% dei pazienti trattati anche dopo la cura.


REATTIVI

- R1** Emazie test: emazie di pollo stabilizzate e sensibilizzate con T. pallidum (Nichols), pH 7.2
R2 Emazie controllo: emazia di pollo stabilizzate, pH 7.2
R3 Diluente: tampone fosfato pH 7.2, estratto treponema di Reiter
R4 Controllo Positivo: siero umano immunizzato prediluito 1:20 (control +)
R5 Controllo Negativo: siero animale (control -)

CAMPIONI

Siero fresco o plasma. Stabile 8 giorni a 2-8°C o 3 mesi a -20°C.
 Campioni con presenza di fibrina devo essere centrifugati. Non utilizzare campioni fortemente emolitici o lipemici.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

 I componenti di origine umana sono stati testati e trovati negativi per la presenza di HbsAg, HCV e anticorpi HIV (1/2). Tuttavia maneggiare con cautela come potenzialmente infettivi.

Attenzione: i reattivi contengono Sodio Azide (0.095%) come conservante. Evitare l'ingestione ed il contatto con pelle, occhi e mucose.

CALIBRAZIONE

La sensibilità del reagente è stata calibrata verso il 1° Standard Internazionale per siero sifilitico (WHO).

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i componenti del kit sono stabili fino alla scadenza stampata sull'etichetta se conservati ben chiusi a 2-8°C e protetti da contaminazione durante l'uso. Non congelare: il congelamento può cambiare la funzionalità del test. Conservare i flaconi in posizione verticale, la posizione orizzontale può portare ad aggregati cellulari. **Deterioramento del reattivo:** presenza di particelle e torbidità.

MATERIALI AUSILIARI

Micropiastre per titolazioni con pozzetti a "U".

PROCEDIMENTO QUALITATIVO

1. Portare i reattivi ed i campioni a 15-25°C.
2. Diluire il campione 1:20 con diluente **R3** (10 µl siero + 190 µl diluente)
3. Pipettare nei pozzetti delle piastre (nota 1).

Campione 1:20 o Controlli	25 µl	25 µl
Emazie controllo	75 µl	- -
Emazie test	- -	75 µl

4. Mescolare fino a completa omogeneizzazione nei pozzetti delle micropiastre.
5. Coprire le micropiastre ed incubare a 15-25°C per 45-60 minuti (nota 2).
6. Esaminare microscopicamente i pattern di agglutinazione.

PROCEDIMENTO SEMIQUANTITATIVO

1. Preparare una serie di diluizioni al raddoppio del campione diluito 1:20 nel diluente (R3)
2. Testare ogni diluizione come descritto nel metodo qualitativo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Leggere i risultati preparando i pattern di agglutinazione dei test con quelli dei controlli (nota 3). Le letture sono registrate con il seguente criterio.

Grado di agglutinazione	Letture	Risultato
Agglutinazione completa che copre tutto il pozzetto	4+	positivo
Agglutinazione che copre parte del pozzetto	3+	positivo
Agglutinazione debole circondata da un cerchio rosso	2+	positivo
Agglutinazione molto debole ricoprente un'area minore circondata da un cerchio rosso più fino	1+	positivo
Bottoni di emazia con un piccolo foro al centro	±	borderline
Bottoni compatti di emazia talvolta con un foro centrale molto piccolo	-	negativo

Il controllo negativo non deve mostrare alcuna agglutinazione sia con le emazia test (R1) che con le emazia controllo (R2). Il controllo positivo deve agglutinare solo la emazia test. Ogni agglutinazione mostrata dalle emazia di controllo indica la presenza di anticorpi specifici e non può essere interpretata.

Campioni borderline devono essere ritestati e riportati come negativi se il risultato si ripete. Campioni positivi devono essere titolati con le metodiche semiquantitative.

Il titolo è dato dalla più elevata diluizione in cui si riscontra agglutinazione.

La diagnosi clinica non può essere basata su un singolo test, ma deve essere integrata con altri esami.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomandano controlli positivi e negativi per monitorare la performance della procedura, così come un campione comparativo per una migliore interpretazione dei risultati.

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

1. Sensibilità analitica: determinazione del titolo in accordo con il materiale di riferimento alle condizioni descritte (v. "Calibrazione").
2. Effetto prozona: non ci sono effetti prozona fino alla titolazione $\geq 1:163840$ (nota 4).
3. Sensibilità diagnostica: 99.5%
4. Specificità diagnostica: 100%

INTERFERENZE

La bilirubina non interferisce sino alla concentrazione di 20 mg/dl.

L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 10 g/l.

Lipemia non interferisce sino alla concentrazione di 10 g/l.

Il fattore reumatoide non interferisce alla concentrazione di 300 IU/ml.

Altre sostanze possono interferire.

NOTE

1. Agitare vigorosamente entrambi i flaconi delle emazia di controllo e del test subito prima dell'utilizzo.
2. Tenere la micropiastra lontano da vibrazioni, calore e luce diretta.
3. I pattern di agglutinazione delle emazia di controllo non devono essere utilizzati come riferimento per risultati negativi in quanto le emazia controllo danno bottoni più compatti delle emazia test.
4. Sieri molto elevati possono dare agglutinazioni con molte screpolature.

LIMITI DEL TEST

- Il test del TPHA non può discriminare anticorpi verso T.Pallido da anticorpi verso altri treponemi patogeni.

Si raccomanda di confermare i risultati positivi con procedure alternative come (FTA-Abs).

- Risultati falsi positivi sono a volte presenti in pazienti con mononucleosi, lebbra, borreliosi, malattie autoimmuni e tossicodipendenti.

- Il test del TPHA non è utilizzabile nel determinare la efficacia della terapia, in quanto i livelli anticorpali restano elevati anche per lungo tempo dopo la cura.

BIBLIOGRAFIA

Paris hamelin et al. Feuillets de Biologie 1983; 24(133); 35-42.

Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1966; 19:305-308.

Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1969; 22:341.

Sandra A Larsen et al. A manual of Test for Syphilis American Public Health Association 1990; 1-192.

Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACC Press, 195.

SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Rischio biologico



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante

Qualitative determination of anti-Treponema pallidum antibodies Passive hemagglutination method

PRINCIPLE

The TPHA (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 patterns.

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 T.pallidum (Nichols) antigens, pH 7.2
R2 Control Cells (CC): stabilized suspension of avian erythrocytes, pH 7.2
R3 Diluent (DIL): phosphate buffered saline, pH 7.2, T.pallidum (Reiter) extract.
R4 Positive control: immune human serum prediluted 1:20 (control +)
R5 Negative control: animal serum (control -)

SAMPLES

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

PRECAUTION IN USE

 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.

Caution: the reagents contain Sodium Azide (0.095%) as preservative. Avoid swallowing and contacting with skin, eyes and mucous membranes.

CALIBRATION

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

STORAGE AND STABILITY

All the kit components are ready to use, and 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.

Reagents deterioration: presence of clusters, particles and turbidity.

ADDITIONAL EQUIPMENT

U-well microtitration plates.

QUALITATIVE PROCEDURE

- Allow the reagents and samples to 15-25°C.
- Dilute serum 1:20 with Diluent. (10 µl serum + 190 µl diluent)
- Pipette into adjacent wells of a microtitration plate (note 1):

Sample 1:20 or Controls	25 µl	25 µl
Control Cells	75 µl	- -
Test Cells	- -	75 µl

- Mix thoroughly the microplate till the complete homogenisation of the mixing reaction.
- Cover the microplate and incubate at 15-25°C for 45-60 minutes (note 2).
- Examine macroscopically the agglutination patterns of the cells.

SEMIQUANTITATIVE PROCEDURE

- Make two fold dilutions of the prediluted 1:20 sample in diluent.
- Test each dilution as described in the qualitative method.

READING AND INTERPRETATION

Read the result by comparing the agglutination patterns of the test cells with the control cell (note 3). Reading 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 negative 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 the procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Analytical sensitivity: accurate titer determination of the reference material, under the described assay conditions (see, calibration).
- Prozone effect: no prozone effect was detected up to titers $\geq 1:163840$ (note 4).
- Diagnostic sensitivity: 99.5%
- Diagnostic specificity: 100%

INTERFERENCES

Bilirubin does not interfere up to concentration of 20 mg/dl.

Hemoglobin does not interfere up to concentration of 10 g/l.

Rheumatoid factors do not interfere up to concentration of 300 IU/ml.

Other substances may interfere.

NOTE

- Shake vigorously the vials of both test and control cells immediately before use.
- Keep the microplate away from the vibrations, heat and direct sunlight.
- 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.
- 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 result 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

Paris hamelin et al. Feuilets de Biologie 1983; 24(133); 35-42.

Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1966; 19:305-308.

Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1969; 22:341.

Sandra A Larsen et al. A manual of Test for Syphilis American Public Health Association 1990; 1-192.

Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACCC Press, 195.

SYMBOLS



Red instruction for use



Biological risk



CE mark (requirement of 98/78 CE regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer