

TPHA TEST

Per uso Diagnostico *in Vitro*

Determinazione qualitativa e quantitativa mediante emo-agglutinazione passiva di anticorpi anti-Treponema pallidum

I. INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

La sifilide, conosciuta anche come *lue* è una malattia infettiva a prevalente trasmissione sessuale. È causata da un batterio, il *Treponema pallidum*, dell'ordine delle spirochete, che si presenta al microscopio come un piccolo filamento a forma di spirale. *Treponema Pallidum* Haemagglutination (TPHA) è un test di emoagglutinazione indiretta per la determinazione e la titolazione degli anticorpi contro l'agente eziologico della sifilide. Il kit TPHA è progettato per la determinazione di anticorpi anti *Treponema Pallidum* nel siero e plasma umano

II. PRINCIPIO DEL TEST

Gli anticorpi anti-Treponema Pallidum, contenuti nel siero o nel plasma del campione, causano l'agglutinazione di emazie sensibilizzate con estratti antigenici di *Treponema Pallidum*.

III. REAGENTI E MATERIALI

Emazie Test:

Ciascun kit contiene:

Emazie di pollo tannate e ricoperte con antigene estrattivo totale di *Treponema pallidum* coltivato in testicoli di coniglio; conservanti.

Emazie di pollo non sensibilizzate; conservanti.

Siero stabilizzato reattivo con le emazie test; conservanti.

Siero stabilizzato non reattivo con le emazie test; conservanti.

Soluzione salina, conservanti e stabilizzanti.

Emazie Controllo:

Controllo Positivo CP (prediluito 1:20):

Controllo Negativo CN (prediluito 1:20):

Diluyente:

I reattivi sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta se conservati ben chiusi a +4°C e se si previene contaminazione durante il loro utilizzo. Non congelare. Il congelamento dei reagenti potrebbe modificare la funzionalità. Conservare i flaconi in posizione verticale; la conservazione in posizione orizzontale potrebbe favorire la formazione di cluster cellulari che possono compromettere la funzionalità dei test.

Calibrazione

Il controllo positivo è calibrato con 1st International Standard for Syphylitic serum (WHO)

Materiale richiesto (non fornito)

Normale strumentazione di laboratorio.

Micropiastra a fondo a "U", micropipette, centrifuga, provette da centrifuga.

IV. PREPARAZIONE DEI REAGENTI E STOCCAGGIO

I reattivi sono pronti all'uso. Le sospensioni di Emazie vanno rese omogenee agitando molte volte per dolce inversione.

Stabilità: fino alla scadenza indicata in etichetta conservati a 2-8°C. Non congelare.

V. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per solo uso professionale ed *in Vitro*.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza e non usare il test se la confezione è danneggiata.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio, indossare indumenti protettivi, guanti monouso, non mangiare bere o fumare nell'area di lavoro.
- Non pipettare con la bocca
- I campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Il test deve essere va eliminato in apposito contenitore in accordo alle Norme vigenti e schede informative in materia di sicurezza
- I reattivi sono stati testati per HBsAg ed anticorpi anti-HIV, anti-HCV risultando negativi. Tuttavia vanno trattati come potenzialmente pericolosi
- Tutti i Reattivi contengono sodio azide 0.095% come conservante. Non ingerire, evitare il contatto con la pelle e le mucose
- Non scambiare reagenti di lotti diversi

VI. CAMPIONI E PREPARAZIONE

Siero o plasma citrato non emolizzati. Stabilità 7 giorni a 2-8°C. o 3 mesi a -20°C.

I campioni congelati devono essere scongelati e mescolati accuratamente prima dell'uso

VII. PROCEDURA

Portare i reattivi ed i campioni a T.A. Agitare accuratamente le sospensioni di emazie prima dell'uso.

Metodo Qualitativo

Predisporre delle diluizioni del siero in esame pipettando, in una micropiastra a fondo a "U", secondo lo schema riportato, diluyente e siero. (Se si processano i controlli, tenere presente che sono già prediluiti, pertanto dispensare 25 µL di controlli tali e quali nel pozzetto 2 e nel pozzetto 3).

Utilizzando la medesima pipetta (aspirando e scaricando più volte) miscelare accuratamente il contenuto del pozzetto prima di trasferirlo nel pozzetto successivo.

Agitare dolcemente la micropiastra per ottenere una corretta miscelazione dei reagenti nei pozzetti. Disporre la micropiastra su un piano ed incubarla a temperatura ambiente e al riparo da vibrazioni e dalla luce per 45-60 minuti. La micropiastra può essere letta anche dopo 24 ore.

POZZETTO	1	2	3
REAGENTI			
Diluyente (µl)	190	---	---
Siero Paziente µl	10	25 dalla 1	25 dalla 1
Emazie di Controllo (µl)		75	---
Emazie Test (µl)		---	75

Metodo Quantitativo per i campioni umani

Ciascun campione richiede 8 pozzetti della micropiastra per la titolazione. Procedere come indicato nello schema sottostante. Eliminare 25 µL dall'ultimo pozzetto di ogni serie. Disporre la micropiastra su un piano ed incubarla a temperatura ambiente e al riparo da vibrazioni e dalla luce per 45-60 minuti. La micropiastra può essere letta anche dopo 24 ore

POZZETTO	1	2	3	4	5	6	7	8
REAGENTI								
Diluyente (µl)	190	---	---	25	25	25	25	25
Siero Paziente (µl)	10	25 dal pozzetto 1	25 dal pozzetto 1	25 dal pozzetto 1	25 dal pozzetto 4	25 dal pozzetto 5	25 dal pozzetto 6	25 dal pozzetto 7, eliminare 25
Emazie di Controllo (µl)	---	75	---	---	---	---	---	---
Emazie Test (µl)	---	---	75	75	75	75	75	75
Titolo		Controllo	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560

Metodo Quantitativo per i Controlli

Utilizzare controllo positivo e controllo negativo, ricordarsi che sono già prediluiti 1:20, il titolo sarà $\geq 1:320$. Disporre la micropiastra su un piano ed incubarla a temperatura ambiente e al riparo da vibrazioni e dalla luce per 45-60 minuti. La micropiastra può essere letta anche dopo 24 ore



POZZETTO	1	2	3	4	5	6	7	8
REAGENTI								
Diluente (µl)				25	25	25	25	25
Controlli Positivo/Negativo (µl)	100	25 dal pozzetto 1	25 dal pozzetto 1	25 dal pozzetto 1	25 dal pozzetto 4	25 dal pozzetto 5	25 dal pozzetto 6	25 dal pozzetto 7, eliminare 25
Emazie di Controllo (µl)	---	75	---	---	---	---	---	---
Emazie Test (µl)	---	---	75	75	75	75	75	75
Titolo		Controllo	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560

VIII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Osservare i pozzetti.

Il risultato negativo è evidenziato dalla comparsa di un precipitato netto di emazie non agglutinate (fondello), mentre il risultato positivo è contraddistinto dalla presenza di un emoagglutinato uniformemente distribuito su tutto il fondo del pozzetto.

I campioni risultati positivi devono essere titolati. Il titolo è dato dalla massima diluizione che manifesta una reazione positiva (ad esempio: pozzetto 3: 1:80; pozzetto 4: 1:160; ecc.).

Un risultato indeterminato è caratterizzato dalla presenza di un fondello di emazie con un piccolo buco al centro tale da avere l'aspetto di un anello ben definito e denso con fondo chiaro. In questo caso il campione deve essere ritestato.

Un risultato non specifico si ha con positività sia sulle emazie test che di controllo, il test va considerato non valido ed indica la presenza di anticorpi agglutinanti aspecifici nel campione. In questo caso adsorbire:

1. Aggiungere 15µl di campione a 0.3 ml di emazie di controllo in un piccolo tubo. Miscelare accuratamente ed incubare per 60 minuti.
2. Centrifugare per 15 minuti a 1000 rpm. Il surnatante deve essere quindi ritestato miscelando 0.025 ml di siero trattato con 0.075 ml di Emazie Test e procedere come nella prova qualitativa.

Note: Per i sieri che mostrano ripetutamente una reazione positiva si esegue un test per le reagine (RPR Test - Cod. UC80600 - UC80610- UC80610A) e un test di conferma per avere un completo profilo del siero in esame (FTA-ABS)

IX. LIMITI DEL KIT /NOTE

Il Controllo Positivo evidenzia una netta agglutinazione ed un titolo > 1:80.

Il Controllo Negativo evidenzia un bottone molto marcato in tutti i pozzetti.

Il pozzetto 2 di controllo (emazie di controllo) deve dare un bottone centrale di cellule non agglutinate. Questo indica che il siero in esame è negativo e adatto alla prova.

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva non può basarsi sul risultato di un singolo test, ma deve essere confermata da ulteriori analisi.

X. CARATTERISTICHE FUNZIONALI

Specificità

Due studi indipendenti su 1710 sieri di donatori hanno dato il 100 % di consensi con altri metodi esistenti in commercio.

Sensibilità

Uno studio su 110 campioni positivi ha dato il 100 % di risultati positivi. Questi includevano 2 campioni risultati negativi testandoli con un altro test TPHA in commercio, ma confermati positivi da metodo FTA e IgM EIA.

Effetto Prozona

Non si ha effetto prozona fino ad un titolo \geq 1/63840

Interferenze

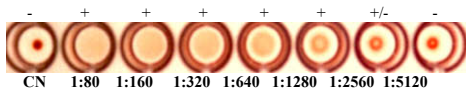
Bilirubina, Emoglobina, Fattori Reumatoidi e Lipidi non interferiscono nel test.

False positività sono state riscontrate in malati di lebbra, mononucleosi infettiva e malattie del connettivo.

Controllo Qualità interno

Il kit viene fornito di controlli che dovrebbero essere sempre usati per poter distinguere una eventuale agglutinazione di fondo del reattivo.

Vedere di seguito la guida illustrata



XI. BIBLIOGRAFIA

1. Tomizawa T. e Kasamatsu S. - Jap. J. Med. Sci. Biol. - 19, 305 (1966)
2. Garner M. F., Backhouse J. L., Daskalopoulos G., Walsh J. - Brit. J. Vener. Dis. - 48, 470 (1972)
3. Johnsten N. A. - Brit. J. Vener. Dis. - 48, 474 (1972)
4. Sequeira P. J. L. e Eldridge A. E. - Brit. J. Vener. Dis. - 49, 242 (1973)

CONTENUTO

Kit Composizione	REF. UC80500 (100 test)	REF. UC80515 (300 test)	REF. UD 80502 (Controlli)
Emazie Test	1 x 8 mL	1 x 24 mL	
Emazie Controllo	1 x 8 mL	1 x 24 mL	----
Controllo Positivo CP	1 x 0.5 mL	1 x 1.5 mL	1 x 0.5 mL
Controllo Negativo CN	1 x 0.5 mL	1 x 1.5 mL	1 x 0.5 mL
Diluente	1 x 20 mL	3 x 20 mL	
Metodica	1 pz	1 pz	1 pz

Non incluso nei Kit: **Micropiastre fondo a "U"** (REF. UE91600)

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (DXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Non sterile
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

Codice Ramo CND W0105010302

