

TPHA

Emoagglutinazione in micropiastra

REF. 2029 100 tests



AZIENDA CERTIFICATA DNV
UNI EN ISO 9001:2008
UNI EN ISO 13485:2012



USO PREVISTO

Qualitativa determinazione di anticorpi anti-Treponema pallidum.

PRINCIPIO

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

CAMPIONE

Siero fresco o plasma. Stabile 8 giorni a 2-8°C o 3 mesi a -20°C.

Campioni con presenza di fibrina devono essere centrifugati prima del test.

Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici.

COMPONENTI FORNITI

Reagente (A) Emazie Test Volume = 7.5 ml	Emazie di pollo stabilizzate e sensibilizzate con antigeni T. pallidum (Nichols) pH 7.2. Conservante
Reagente (B) Emazie Controllo Volume = 7.5 ml	Sospensione stabilizzata di emazie di pollo. pH 7.2 Conservante
Reagente (C) Diluyente Volume = 20 ml	Tampone fosfato, pH 7.2, estratto di T. pallidum (Reider). Conservante
Controllo (+) Volume = 1 ml	Siero umano immune prediluito 1:20. Conservante
Controllo (-) Volume = 1 ml	Siero animale. Conservante.

I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta se conservati ben chiusi a 2-8°C. Una volta aperti, i reagenti sono stabili un mese a 2-8°C, in assenza di contaminazioni. Non congelare.

Conservare le fiale in posizione verticale, la posizione orizzontale può causare aggregati cellulari.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Tutti i componenti del kit sono pronti all'uso.

MATERIALI AUSILIARI

Micropiastre per titolazioni con pozzetti a "U".

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Rischio Biologico per il Controllo (+)

I reagenti possono contenere componenti non reattivi e conservanti di varia natura. A scopo cautelativo è opportuno evitare il contatto con la pelle e l'ingestione. Utilizzare le normali precauzioni previste in laboratorio.

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

Smaltire i rifiuti secondo le norme locali vigenti.

PROCEDIMENTO

METODO QUALITATIVO:

Portare i reagenti e i campioni a temperatura ambiente.

Diluire il siero 1:20 con il Reagente (C) Diluyente. (10 µl siero + 190 µl Diluyente)

Pipettare nei pozzetti delle micropiastre: ⁽¹⁾

Campione 1:20 o Controlli ⁽²⁾	25 µl	25 µl
Reagente (A) - Emazie Test	75 µl	---
Reagente (B) - Emazie di Controllo	---	75 µl

Mescolare fino a completa omogeneizzazione nei pozzetti delle micropiastre.

Coprire le micropiastre ed incubare a temperatura ambiente (15-25°C) per 45-60 minuti. (Tenere la micropiastra lontano da vibrazioni, calore e luce diretta).

Esaminare macroscopicamente i pattern di emoagglutinazione.

⁽¹⁾ **Agitare vigorosamente entrambi i flaconi, delle emazie di controllo e delle emazie test, immediatamente prima dell'uso.**

⁽²⁾ **I Controlli sono pronti all'uso. Non devono essere diluiti.**

METODO SEMI-QUANTITATIVO:

Preparare una serie di diluizioni al raddoppio del campione diluito 1:20 nel Diluyente (Reagente C).

Testare ogni diluizione come descritto nel metodo qualitativo.

LETTURA E INTERPRETAZIONE

Leggere i risultati confrontando i pattern di emoagglutinazione dei test con quelli dei controlli ⁽³⁾. Le letture sono registrate con il seguente criterio:

Grado di agglutinazione	Letture	Risultato
Agglutinazione che copre tutto il fondo del pozzetto, a volte con bordi ripiegati.	4+	Positivo
Agglutinazione che copre una parte del fondo del pozzetto.	3+	Positivo
Agglutinazione circondata da un cerchio rosso	2+	Positivo
Agglutinazione che ricopre un'area inferiore e circondata da un cerchio rosso più piccolo	1+	Positivo
Bottoni di cellule che hanno un piccolo foro nel centro		Borderline
Bottoni di cellule ben evidenti e compatto, a volte con un piccolissimo foro al centro.	-	Negativo

Il controllo negativo non deve mostrare alcuna agglutinazione sia con il Reagente A (Emazie Test) che con il Reagente B (Emazie Controllo).

Il controllo positivo deve mostrare agglutinazione solo col il Reagente A (Emazie Test).

Qualsiasi agglutinazione mostrata dalle emazie di controllo (Reagente B) indica la presenza di anticorpi non 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 il metodo semiquantitativo. Il titolo del siero è definito dalla più alta diluizione che mostra un risultato positivo.

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

⁽³⁾ **L'agglutinazione delle Emazie di Controllo non deve essere presa come riferimento per i risultati negativi poiché le Emazie di Controllo danno dei bottoni più compatti delle Emazie Test.**

CONTROLLO DI QUALITA'

Si raccomanda l'uso dei controlli Positivi e Negativi per monitorare le prestazioni del reattivo e per avere una migliore interpretazione dei risultati.

PRESTAZIONI DEL METODO

Sensibilità: Determinazione del titolo in accordo con il materiale di riferimento alle condizioni descritte.

Effetto prozona: Nessun effetto prozona fino a un titolo 1/163840

Sensibilità diagnostica: 99.5 %

Specificità diagnostica: 100 %

Interferenze: la bilirubina non interferisce fino a una concentrazione di 20 mg/dl. Emoglobina e lipemia non interferiscono fino a 10 g/l, il Fattore Reumatoide non interferisce fino a 300 U/ml.

LIMITI DEL METODO

Il TPHA non può discriminare anticorpi anti-T. pallidum da anticorpi verso altri treponema patogeni. Si raccomanda di confermare i risultati positivi con altri metodi equivalenti.

Risultati Falsi positivi si possono avere in pazienti con mononucleosi, lebbra, malattie autoimmuni, assunzione di droghe.

Il test TPHA non è utile per determinare l'efficacia della terapia, in quanto il livello di anticorpi rimane a lungo dopo che la malattia è stata curata e il test rimane positivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Paris Hamelin et al. Feuillet 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 Tests, 4th ed. AACC Press 1995.

Giesse Diagnostics srl

V. Enrico Fermi, 3 - Z.I. V. Tiburtina Km 18.300 - 00012 Guidonia Montecelio (RM) - Italia

Tel. +39 0774 051100 - Fax +39 0774 051111

e-mail: info@giessediagnostics.com - web site: www.giessediagnostics.com

202907
Ed. 2014/11 rev. 02

TPHA

Microplate hemagglutination

REF. 2029 100 tests



DNV CERTIFIED COMPANY
UNI EN ISO 9001:2008
UN EN ISO 13485:2012



INTENDED USE

Qualitative determination of anti-treponema pallidum antibodies.

PRINCIPLE

The TPHA 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.

SAMPLE

Fresh Serum. 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.

KIT COMPONENTS

Reagent (A) Test Cells Volume = 7.5 ml	Stabilized avian erythrocytes sensitised with T. pallidum (Nichols) antigens, pH 7.2. Preservative.
Reagent (B) Control Cells Volume = 7.5 ml	Stabilized suspension of avian erythrocytes. pH 7.2 Preservative.
Reagent (C) Diluent Volume = 20 ml	Phosphate buffered, pH 7.2, T. pallidum (Reider) extract. Preservative.
Control (+) Volume = 1 ml	Immune human serum prediluted 1:20. Preservative.
Control (-) Volume = 1 ml	Animal serum. Preservative.

The Reagents are stable until the expiration date printed on the label, when stored tightly closed at 2-8°C. Once opened, the reagents are stable one month if contamination is avoided. Do not freeze.

Store the vials in vertical position. Horizontal position may cause cellular clusters.

REAGENT PREPARATION

All the kit components are ready to use.

ADDITIONAL EQUIPMENT

U-well microtitration plates.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Biological risk for Control (+)

Reagent may contain some non-reactive and preservative components. It is suggested to handle carefully it, avoiding contact with skin and swallow.

Use the normal precautions required in the laboratory.

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.

Dispose of waste according to local laws.

PROCEDURE

QUALITATIVE METHOD:

Allow the reagents and sample to reach room temperature

Dilute serum 1:20 with Reagent (C) Diluent. (10 µl serum + 190 µl Diluent)

Pipette into adjacent wells of a microtitration plate: ⁽¹⁾

Sample 1:20 or Controls ⁽²⁾	25 µl	25 µl
Reagent (A) - Test Cells	75 µl	---
Reagent (B) - Control Cells	---	75 µl

Mix thoroughly the microplate till the complete homogenisation of the mixing reaction.

Cover the microplate and incubate at room temperature (15-25°C) for 45-60 minutes. (Keep the microplate away from the vibrations, heat and direct sunlight). Examine macroscopically the agglutination patterns of the cells.

⁽¹⁾ Shake vigorously the vials of both Test and Control Cells immediately before use.

⁽²⁾ The Control are ready to use, you have not to dilute them.

SEMI-QUANTITATIVE METHOD:

Make two fold dilutions of the prediluted 1:20 sample in Diluent (Reagent C).

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 ^(a). 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 Reagent A (Test Cells) and Reagent B (Control Cells).

The Positive Control should only show agglutination patterns with Reagent A (Test Cells).

Any agglutination pattern showed by Control Cells (Reagent B) 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 tittered following the semi-quantitative method. The serum titer is defined as the highest dilution showing reactive result.

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

^(a) 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.

QUALITY CONTROL

Positive and Negative Controls are recommended to monitor the performance of the reagent and to have a better results interpretation.

PERFORMANCE

Sensitivity: Accurate titer determination of the Reference Material, under the described assay conditions.

Prozone Effect: No prozone effect up to titers 1/163840

Diagnostic sensitivity: 99.5 %

Diagnostic specificity: 100 %

Interferences: bilirubin does not interfere up to 20 mg/dl. Hemoglobin and lipemia do not interfere up to 10 g/l, Rheumatoid factors up to 300 U/ml do not interfere.

METHOD LIMITATIONS

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.

False Positive Results have been described with sample of patients with mononucleosis, leprosy, 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 test remains positive.

REFERENCES

1. Paris Hamelin et al. Feuilles 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 Tests, 4th ed. AACC Press 1995.

Giesse Diagnostics srl

V. Enrico Fermi, 3 - Z.I. V. Tiburtina Km 18.300 - 00012 Guidonia Montecelio (RM) - Italia

Tel. +39 0774 051100 - Fax +39 0774 051111

e-mail: info@giessediagnostics.com - web site: www.giessediagnostics.com

202907
Ed. 2014/11 rev. 02