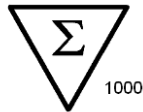




MICROSYPH™ TPHA1000

IVD

REF **FTPHA1000**



Sólo para uso profesional



Axis-Shield Diagnostics Limited
The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.
Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.
E-mail: shield@uk.axis-shield.com
Web: www.axis-shield.com

MICROSYPH™ TPHA1000 es un ensayo rápido para la detección de anticuerpos específicos al *Treponema pallidum* en plasma o suero humano (tanto EDTA dipotásico, citrato de sodio como heparina de litio) mediante hemaglutinación indirecta. El kit está destinado a su utilización como prueba de despistaje inicial.

INTRODUCCIÓN

La sífilis es una enfermedad venérea provocada por la espiroqueta *Treponema pallidum*. Ya que este organismo no puede cultivarse *in vitro*, el diagnóstico de sífilis depende de la correlación de los datos clínicos con los anticuerpos específicos mostrados por las pruebas serológicas. La realización de las pruebas serológicas de despistaje para la sífilis que utilizan cardioplipina y lecitina como antígenos es sencilla, pero es frecuente que se produzcan reacciones de falsos positivos biológicos (FPB) ya que estas pruebas utilizan antígenos no treponémicos¹. Las pruebas TPI y FTA-ABS utilizan *T. pallidum* patógeno como antígeno, pero estas pruebas presentan ciertas dificultades para el serodiagnóstico rutinario. La prueba TPI requiere *T. pallidum* patógeno vivo y la prueba FTA-ABS requiere un microscopio de fluorescencia. Ambas pruebas requieren un gran nivel de experiencia.

Se ha demostrado que los ensayos TPHA son una prueba específica y conveniente para el diagnóstico de la infección por treponema y tienen una especificidad similar a la de la prueba TPI⁶ y una sensibilidad comparable a la de la prueba FTA-ABS⁷. Requiere un equipo de laboratorio mínimo y su realización es muy sencilla. Puede usarse junto con sistemas de manipulación de líquidos automatizados que mejoran la productividad de los laboratorios.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

La prueba MICROSYPH™ TPHA1000 detecta anticuerpos (suero/plasma) humanos contra *T. pallidum* por medio de un método de hemaglutinación indirecta (IAH). Los eritrocitos aviares conservados están recubiertos con componentes antigénicos de *T. pallidum* patógeno (cepa de Nichol)²⁻⁵. Estas Células de Prueba se aglutinan en presencia de anticuerpos específicos contra *T. pallidum* y muestran modelos característicos en placas de microvasos.

Los anticuerpos contra treponemas no patógenos son absorbidos por un extracto de treponemas de Reiter incluido en la suspensión celular. Los resultados de la prueba se obtienen en 60 minutos y los modelos de aglutinación celular son fácilmente legibles y estables.

Para facilitar la fase de dilución necesaria se ha añadido una tintura azul al Diluyente. Ésta cambia el color cuando se añade la muestra.

COMPONENTES DEL KIT

TEST CELLS	2 x 40mL	<p>Eritrocitos aviares conservados recubiertos con antígeno <i>T. pallidum</i> en el búfer.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Las Células de Prueba deben volver a suspenderse por completo antes de su uso. <input type="checkbox"/> Las Células de Prueba se asientan cuando se guardan. <input type="checkbox"/> Es importante que las células asentadas se cubran con el búfer durante el almacenamiento a 2-8°C.
DIL	1 x 250mL	<p>Búfer que contiene tintura azul. Contiene 0,1% de azida sódica como conservante.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Listo para su uso.
CONTROL +	1 x 0,5mL	<p>Desfibrinada plasma sífilítica humano que contiene anticuerpos contra <i>T. pallidum</i>. El plasma humano utilizado es no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, el antígeno VIH y los anticuerpos VIH cuando se comprueba con ensayos autorizados por la FDA.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Diluir antes de usar.
CONTROL -	1 x 0,5mL	<p>El suero humano es no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, el antígeno HIV y los anticuerpos HIV cuando se comprueba con ensayos autorizados por la FDA. Contiene 0,1% de azida sódica como conservante.</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Diluir antes de usar.

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Los reactivos de cada kit han sido clasificados para producir la reacción apropiada y no deben intercambiarse con los de otros lotes.

El kit debe guardarse verticalmente a 2-8°C en todo momento. No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad. Los reactivos deben descartarse si se contaminan o no muestran actividad con los Controles Reactivos y No Reactivos.

Un kit fue abierto y reutilizado en cinco ocasiones durante un período de 52 semanas sin consecuencias adversas para su rendimiento.

OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Se pueden utilizar muestras de plasma o suero. Guardar a 2-8°C si se añade un conservante, por ejemplo, 0,1% de azida antes del almacenamiento. Para almacenamiento de larga duración, las muestras deben guardarse a -20°C. Hay que eliminar mediante centrifugación todas las partículas visibles antes del ensayo.

DILUCIÓN DE LA MUESTRA

Las Muestras, los Controles Reactivos y los Controles No Reactivos deben diluirse 1 en 20 en Diluyente. El Diluyente contiene una tintura azul que cambia visiblemente el color de azul a amarillo/verde pálido cuando se añade la muestra.

Para la confirmación espectrofotométrica del añadido de la muestra, diluir las muestras de acuerdo con los pasos 1-2 del Protocolo del Ensayo. Antes de continuar con el paso 3, leer la placa de microvasos en un lector de placas a 450nm utilizando 690nm como longitud de onda de referencia si está disponible. Si la densidad óptica (O.D.) es inferior a 0,2, se debe sospechar un volumen insuficiente de la muestra y preparar una dilución nueva.

Observar que los Controles Reactivos y No Reactivos pueden proporcionar lecturas O.D. inferiores a 0,2 debido a su composición, de modo que se debe prestar una atención especial para garantizar que se añade el Control.

Las diluciones sólo deben usarse el día de la preparación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Únicamente para diagnóstico in vitro.

1. Seguir estrictamente las instrucciones de este prospecto, especialmente respecto a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Evitar estrictamente la contaminación con saliva de cualquiera de las diluciones de la muestra o reactivos, ya que esto provocará modelos confusos similares a un resultado positivo con muestras que deberían ser negativas.
3. Los controles contienen suero o plasma humano comprobado mediante ensayos autorizados por la FDA para el antígeno de superficie de la hepatitis B, HCV, el antígeno HIV y los anticuerpos HIV y que han demostrado ser no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece la garantía total de ausencia de agentes infecciosos, los Controles deben ser considerados como potencialmente infecciosos y manipulados con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. Departamento de Servicios de salud de EE. UU. (US Department of Human Health Services) „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos), 5ª edición, Washington, D.C. Imprenta del Gobierno de los EE. UU. (US Government Printing Office), enero de 2007,¹⁴ describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio.
4. No pipetar con la boca.
5. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
6. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes, quemaduras y otras lesiones de la piel.
7. El Control No Reactivo y el Diluyente contienen 0,1% de azida sódica.

Diluyente	EUH032	En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
Control Negativo		

Aunque la concentración de azida presente es baja, para impedir la acumulación de sales de cobre o plomo explosivas, estos materiales no deben desecharse por fregaderos con tuberías o sifones metálicos. Todas las tuberías deben lavarse minuciosamente con agua después de su uso.

8. Pueden solicitarse a Axis-Shield Diagnostics las hojas técnicas de seguridad del material para todos los componentes contenidos en este kit.

PREPARACIÓN

Materiales/Equipo Necesario No Incluido

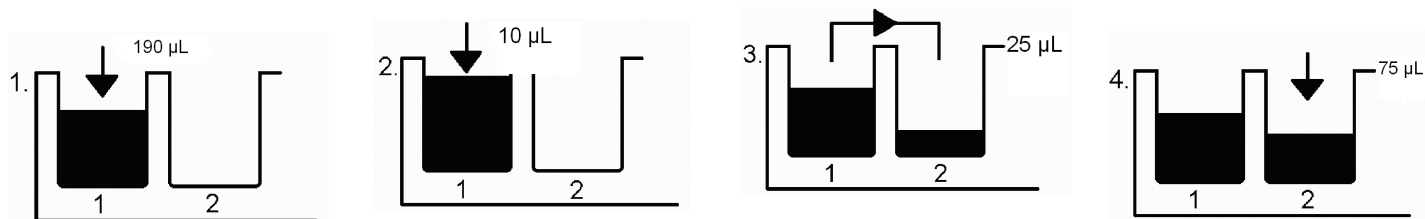
1. Pipetas de precisión y adecuadamente mantenidas para proporcionar 10, 25, 75 y 190 microlitros.
2. Placas de microvasos rígidas con vasos en forma de "U".
3. Sistema de lectura de placas de microvasos y/o procesadores automatizados (opcional). Todos los instrumentos y el software de interpretación deben validarse antes de ser utilizados y deben emplearse, mantenerse y calibrarse de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Materiales Proporcionados

FTPFA1000 contiene reactivos suficientes para llevar a cabo manualmente 1000 pruebas. El número de pruebas obtenido utilizando sistemas automatizados dependerá de las características del sistema.

PROTOCOLO DEL ENSAYO

1. Cada prueba requiere 2 vasos de una placa de microvasos. Limpiar la placa de microvasos con un paño húmedo y limpio para eliminar cualquier carga estática. Añadir 190 μ L de Diluyente al Vaso 1.
2. Añadir 10 μ L de Muestra al Vaso 1. Utilizando una pipeta, mezclar el contenido del Vaso 1. Nota: Son necesarios otros dos juegos de vasos para los Controles Reactivo y No Reactivo. Los Controles deben tratarse exactamente del mismo modo que las muestras.
3. Transferir 25 μ L al Vaso 2.
4. Añadir 75 μ L de Células de Prueba nuevamente suspendidas totalmente a los vasos que contienen 25 μ L de Control o muestra diluida.



5. Mezclar el contenido de la placa dando ligeros golpecitos en los cuatro lados de la placa.
6. Incubar a temperatura ambiente durante un mínimo de 60 minutos.

Precaución: Mantener la placa lejos de fuentes de calor, luz directa del sol y cualquier causa de vibración.

7. Leer los resultados. Si se utiliza un lector, leer visualmente la placa en primer lugar, ya que el lector puede agitar la placa cuando es expulsada del instrumento.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Visualmente

Resultado positivo

Un fuerte positivo aparecerá como una esterilla lisa de células situada en la parte inferior del vaso, en ocasiones, con los bordes plegados. Con muestras que reaccionen con menos fuerza, esta esterilla será menor y puede estar rodeada por un anillo de células.

Resultado Negativo

Los resultados negativos aparecen indicados por un botón compacto de células, con o sin un orificio diminuto en el centro.

Resultado Indeterminado

Los resultados indeterminados se observan como un botón de células que tienen un orificio pequeño en el centro, lo que proporciona la apariencia de un anillo denso y bien definido con un fondo bastante claro alrededor de dicho anillo.

Resultado Colapsado

Algunas muestras muy fuertemente positivas pueden proporcionar modelos colapsados cuando se comprueban con una dilución 1/80. Estos modelos son similares a un resultado indeterminado, pero el anillo denso puede tener una apariencia desigual.

Espectrofotométricamente

Los resultados obtenidos espectrofotométricamente también deben ser verificados manualmente.

CONTROL DE CALIDAD

El Control No Reactivo no debe provocar aglutinación, mientras que el Control Reactivo debe provocar aglutinación de la prueba. Si esto no es así, el ensayo no es válido y no se deben notificar los resultados de la muestra del paciente. Si se repite la prueba, preparar una dilución nueva de cada muestra y de cada Control.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Todas las muestras que proporcionen un resultado positivo en la prueba deben considerarse reactivas en la prueba. A menos que los procedimientos locales indiquen algo distinto, hay volver a realizar otra prueba por duplicado utilizando la muestra original. Las muestras que son reactivas en, como mínimo, una de las pruebas duplicadas son consideradas repetidamente reactivas en el ensayo MICROSYPH™ TPHA1000. Hay que seguir estudiando estas muestras y considerar los resultados del ensayo junto con otros datos del ensayo y/o clínicos.

Un resultado negativo indica la ausencia de anticuerpos contra *T. pallidum*. En algunos casos muy tempranos de sífilis, se pueden obtener resultados negativos (ver **Limitaciones De Uso**).

Un resultado indeterminado puede indicar un nivel bajo de anticuerpos en una sífilis temprana, en una sífilis antigua tratada o en una frambesia. En estos casos, hay que volver a comprobar la muestra. Si esto no es posible, se debe obtener una muestra nueva lo antes posible y repetir la prueba, teniendo en cuenta la situación clínica del paciente.

LIMITACIONES DE USO

1. El kit MICROSYPH™ TPHA1000 no contiene Células de Control. Por lo tanto, los resultados positivos pueden deberse a una reacción no específica de la muestra con las células. Con el fin de excluir esta posibilidad, todos los reactivos de la muestra de la prueba deben volver a comprobarse utilizando el kit MICROSYPH™ TPHA200 (FTPHA200).

Para la confirmación de un resultado positivo, se debe utilizar la prueba FTA-ABS, ya que permite la diferenciación entre los anticuerpos IgG e IgM tempranos. La prueba FTA-ABS también resulta útil en sífilis muy tempranas, cuando la prueba de hemaglutinación puede ser negativa.

Para el control terapéutico resulta aconsejable utilizar una prueba cuantitativa, por ejemplo, una prueba RPR. Axis-Shield Diagnostics Ltd. dispone de este reactivo

2. Aunque la prueba MICROSYPH™ TPHA1000 es muy específica, se sabe que se han producido falsos positivos en pacientes que padecen lepra, mononucleosis infecciosa y trastornos del tejido conjuntivo.
3. Las pruebas serológicas, incluida MICROSYPH™ TPHA1000, no pueden distinguir entre la sífilis y otras formas de infecciones por treponemas patógenos⁸, por ejemplo, frambesia⁷. Se deben utilizar evidencias clínicas para determinar qué condición está presente.
4. Los anticuerpos contra la sífilis detectados en la prueba MICROSYPH™ TPHA1000 persisten después de un tratamiento con éxito. Por lo tanto, una prueba positiva puede indicar una infección pasada o actual^{6,7,9,10}.
5. Tras la infección con *T. pallidum*, los anticuerpos (tanto antilipoideos como antitreponémicos) pueden no aparecer hasta 1 a 4 semanas después de que se haya formado la lesión sifilítica característica. Por tanto, en la sífilis primaria temprana, pruebas tales como MICROSYPH™ TPHA1000 pueden proporcionar un resultado negativo en algunas muestras^{11,12,13}. Las concentraciones de anticuerpos en las infecciones de sífilis en período de latencia o tratadas pueden disminuir por debajo del límite de detección del ensayo MICROSYPH™ TPHA1000 y por tanto dar resultados negativos. En estos casos, se deben utilizar procedimientos alternativos para la realización de las pruebas, por ejemplo, la identificación microscópica de *T. pallidum*.

6. Los resultados obtenidos utilizando sistemas de lectura de placas deben verificarse manualmente. Dependiendo de los parámetros de la lectura, algunos modelos indeterminados o colapsados pueden interpretarse erróneamente como límites o negativos.
7. Esta prueba se utiliza únicamente con muestras de plasma o suero individuales (no mezcladas).
8. El uso de muestras hemolizadas, suero no coagulado totalmente, muestras de plasma que contienen fibrina o muestras con contaminación microbiana puede dar lugar a resultados erróneos.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Especificidad

Se analizaron internamente 1000 muestras de donantes (500 de suero y 500 de plasma) con un lote de reactivos y otras 1000 muestras de donantes (500 de suero y 500 de plasma) con un segundo lote de reactivos; a continuación se indican los resultados.

Nº de Muestras	Lote de Reactivo	Nº de Muestras Positivas o Indeterminadas		Especificidad
		Inicial	Repetir	
500 Suero	1	0	0	100%
500 Plasma	1	2	0	100%
500 Suero	2	0	0	100%
500 Plasma	2	0	0	100%

Especificidad con muestras de posible reactividad cruzada

71 muestras de posible reactividad cruzada fueron analizadas internamente con un lote de reactivos y otras 72 muestras fueron analizadas internamente con un segundo lote de reactivo; a continuación se indican los resultados.

Nº de Muestras	Lote de Reactivo	Nº de Muestras Positivas o Indeterminadas	Especificidad
71 (ver nota 1)	1	0	100%
72 (ver nota 2)	2	0	100%

Nota 1 : 18 muestras positivas factor reumatoideo, 9 positivas enfermedad de Lyme, 5 positivas anticardiolipina, 16 antenatal, 12 positivas HCV, 6 positivas HIV y 5 positivas HBV

Nota 2 : 18 muestras positivas factor reumatoideo, 9 positivas enfermedad de Lyme, 5 positivas anticardiolipina, 16 antenatal, 12 positivas HCV, 6 positivas HIV y 6 positivas HBV

Sensibilidad

137 muestras que, utilizando los ensayos ELISA fueron positivas, se analizaron internamente con dos lotes de reactivos; los resultados aparecen indicados a continuación.

Nº de Muestras	Lote de Reactivo	Nº de Muestras Negativas	Sensibilidad
137	1	3	97.8%
137	2	2	98.5%

NORMALIZACIÓN

Se ha demostrado que la prueba MICROSYPH™ TPHA1000 proporciona una reacción de aglutinación del 50% con la preparación de referencia WHO 3-1980 con una titulación entre 1/2560 y 1/10240 utilizando tres lotes de reactivos y cinco operadores.

REFERENCIAS

1. **Garner, M.F. et al** (1973). The *Treponema pallidum* haemagglutination (TPHA) test in biological false positive and leprosy sera. *J. Clin. Path.*, **26**, 258.
2. **Rathlev, T.** (1965). Haemagglutination tests utilising antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. W.H.O./VDT/RES/77.65.
3. **Rathlev, T.** (1967). Haemagglutination test utilising pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. *Brit. J. Vener. Dis.*, **43**, 181.
4. **Tomizawa, T. et al.** (1966). Hemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **19**, 305.
5. **Tomizawa, T. et al.** (1969). Usefulness of the hemagglutination test using *Treponema pallidum* antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **22**, 341.
6. **Sequeira, P.J.L. et al** (1973). Treponemal haemagglutination test. *Brit. J. Vener. Dis.*, **49**, 242.
7. **Johnston, N.A.** (1972). *Treponema pallidum* haemagglutination test for syphilis. Evaluation of a modified micro-method. *Brit. J. Vener. Dis.*, **48**, 474.
8. **Cox, P.M. et al.** (1969). Automated, quantitative microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies. *Appl Microbiol.*, **18**, 485.
9. **Uete, T. et al** (1971). Clinical evaluation of the *T. pallidum* haemagglutination test. *Brit. J. Vener. Dis.*, **47**, 73.
10. **Young, H. et al** (1974). *Treponema pallidum* haemagglutination test as a screening procedure for the diagnosis of syphilis. *Brit. J. Vener. Dis.* **50**, 341. *Appl. Microbiol.*, **24**, 26.
11. **Coffrey, E.M. et al** (1972). Evaluation of the qualitative and automated quantitative microhemagglutination assay for antibodies to *Treponema pallidum*. *Appl. Microbiol.* **24**, 26.
12. **Dyckman, J.D. et al** (1980). Reactivity of microhemagglutination, fluorescent treponemal antibody absorption, and venereal disease research laboratory tests in primary syphilis. *J. Clin. Micro.*, **12**, 629.
13. **Larsen, S.A. et al** (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Micro. Rev.*, **8**, 1. *Clin. Micro. Rev.*, **8**, 1.
14. US Department of Human Health Services "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5th Edition, Washington, DC: US Government Printing office, January 2007.

SYMBOLS



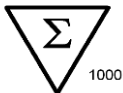
Para uso en diagnóstico *in vitro*



Número de catálogo



Lote



Suficiente para 1000 pruebas



Precaución: Consulte los documentos adjuntos



Utilizar antes de



Conservar a 2-8°C



Control Positivo



Control Negativo



Células de Prueba



Diluyente



Número Global de Artículo Comercial



Fabricante



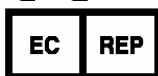
Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Website: www.axis-shield.com



EC Authorized Representative:

Medical Device Safety Service GmbH (MDSS)

Schiffgraben 41,
30175 Hannover,
Germany

Tel.: + (49) 511 6262 8630

Fax: + (49) 511 6262 8633

Ver:2019/09