



FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos dirigidos contra *Treponema pallidum* presentes en suero humano provocan la aglutinación de los hematíes de ave en suspensión, sensibilizados con antígenos de *T.pallidum*^{1,2}

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Células Sensibilizadas. 2 x 7,5 mL. Suspensión estabilizada de hematíes de ave sensibilizados con antígenos recombinantes de *T.pallidum*, azida de sodio 0,95 g/L.
- B. Células Control. 2 x 7,5 mL. Suspensión estabilizada de hematíes de ave, azida de sodio 0,95 g/L.
- C+. Control positivo. 1 mL. Suero inmune animal, azida de sodio 0,95 g/L.
- C-. Control negativo. 1 mL. Suero, azida de sodio 0,95 g/L.
- D. Reactivo. 40 mL. Tampón fosfato salino, pH 7,2, extracto de *T. pallidum* (Reiter), azida de sodio 0,95 g/L.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

El Reactivo, las Células y los Controles son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Células: presencia de aglutinación en el frasco
- Reactivo y Controles: presencia de material particulado.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

A. Células Sensibilizadas y B. Células Control. Homogeneizar por completo los viales de células antes de pipetear (Nota 1).

Los controles y el Reactivo están listos para su uso.

MATERIAL ADICIONAL

- Placas de microtitulación con fondo en "U".

MUESTRAS

Suero o plasma recogido mediante procedimientos estándar. Estable 2 días a 2-8°C.

Diluir la muestra 1/20 en Reactivo D. La muestra una vez diluida es estable 1 día a 2-8°C. Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en Reactivo D a partir de la 1/20.

PROCEDIMIENTO

1. Dejar atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Pipetear 25 µL de cada una de las muestras diluidas, del Control Positivo (C+) y del Control Negativo (C-) por duplicado y en distintos pocillos de la placa de microtitulación.
3. Al primero de los duplicados de muestra o control añadirle 75 µL de Células Sensibilizadas (A) y al segundo de los duplicados, 75 µL de Células Control (B).
4. Mezclar el contenido de la placa golpeando ligeramente los cuatro lados de la misma
5. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 1 hora.

LECTURA

Examinar macroscópicamente los patrones de aglutinación de las células. Comparar siempre los patrones obtenidos en los pocillos de las Células Sensibilizadas con los obtenidos en los pocillos de las Células Control. Evaluar los resultados de acuerdo con el siguiente criterio

Grado de aglutinación	Lectura	Resultado
Capa de células que recubre por completo el fondo del pocillo.	4+	Positivo
Capa de células recubriendo parte del fondo del pocillo.	3+	Positivo
Capa de células rodeadas por un círculo rojo.	2+	Positivo
Capa de células cubriendo menos área y rodeada por un pequeño círculo rojo.	1+	Positivo
Botón de células con un pequeño orificio en el centro.	±	Dudoso
Botón de células compacto y definido, a veces con un pequeño orificio en el centro.	--	Negativo

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Controles Positivo (C+) y Negativo (C-) suministrados con el kit para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

El Control Positivo (C+) provoca aglutinación visible de las Células Sensibilizadas (A) pero no de las Células Control (B).

El Control Negativo (C-) no provoca aglutinación visible con ninguno de los dos tipos de células.

Cualquier aglutinación observada con las células control, indica la presencia de aglutinación inespecífica. Una muestra de este tipo no puede interpretarse con este kit.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

- La sensibilidad analítica del kit BioSystems TPHA es 2×10^4 IU/mL cuando es calculada frente al Patrón Internacional de Sífilis de la OMS de 4.9 IU/mL.
- Resultados falsos: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Aunque el suero es el espécimen de elección, pueden utilizarse muestras de plasma-EDTA. Sin embargo, puesto que se ha descrito una cierta incidencia de falsos positivos, es recomendable confirmar repitiendo la prueba utilizando suero del paciente.
- Esta prueba proporciona resultados positivos durante mucho tiempo tras la curación clínica de la enfermedad, por lo que no debe utilizarse para controlar la eficacia del tratamiento

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La presencia de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* en la muestra analizada mediante TPHA es considerado un resultado de confirmación de sífilis³. Aunque ocasionalmente pueden aparecer falsos positivos en situaciones tales como drogodependencia, lepra, mononucleosis infecciosa y enfermedades autoinmunes, la frecuencia de falsas reacciones positivas es menor que en las otras pruebas treponémicas⁴.

El kit BioSystems TPHA fue usado con 71 sueros caracterizados previamente determinados positivos y 597 sueros previamente determinados negativos. La sensibilidad resultó del 97,2% y la especificidad del 99,8%.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Conservar los viales en posición vertical. La conservación de los viales en posición horizontal puede ocasionar la aparición de agregados celulares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tomizawa T, Kasamatsu S, Yamaya S. Usefulness of the Haemagglutination Test Using *Treponema pallidum* Antigen (TPHA) for the Serodiagnosis of Syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969; 22: 341-350.
2. Sequeira P.JL and Eldridge AE. Treponemal haemagglutination test. Brit J vener Dis 1973; 49: 242 - 248.
3. Larsen SA, Hambie EA, Pettit DE, Perryman MW, Kraus SJ. Specificity, sensitivity and Reproducibility Among the Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption Test, the Microhemagglutination Assay for *Treponema pallidum* Antibodies and the Hemagglutination Treponemal Test for Syphilis. J Clin Microbiol 1981; 14(4): 441-445.
4. Peter CR, Thompson MA and Wilson DL. False-Positive Reactions in the Rapid Plasma Reagin-Card, Fluorescent Treponemal Antibody-Absorbed, and Hemagglutination Treponemal Syphilis Serology Tests. J Clin Microbiol 1979; 9(3):369-372.