



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE
„CANTACUZINO”

Splaiul Independenței 103, București, 050096

LABORATORUL NATIONAL DE REFERINTA PENTRU ITS

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Functia	Sef laborator	Sef laborator	Director LNR
Nume prenume	Dr.Dan Ionescu		
Semnatura*			
Data			

* Semnatura se aplică pe documentul original

PROCEDURA SPECIFICĂ

DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN TESTUL TPHA

Cod:

Editia :

Revizia :

Data aplicarii :

Avertisment Documentul de fata este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »
Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»
Copiile sunt numerotate si controlate.

Exemplar nr : _____

Destinatarul: _____

Exemplar : controlat necontrolat

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN TESTUL TPHA	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
	cod :	Data aplicării:

CUPRINS

INDICATORUL APROBARILOR SI REVIZIILOR.....	2
CUPRINS.....	3
1. SCOP.....	4
2. DOMENIUL DE APLICARE	4
3. DOCUMENTE DE REFERINTA.....	4
4. DEFINITII SI PRESCURTARI	4
5. DESCRIEREA ACTIVITATII	4
5.1. CONDIȚII PRELABILE	4
5.2. RESURSE NECESARE	5
5.3. EXECUȚIA TESTULUI TPHA	5
5.3.1. ETAPE PRELIMINARE	5
5.3.2. PREGATIREA PROBELOR PENTRU TESTARE	5
5.3.3. EXECUTIA TESTULUI CALITATIV	5
5.3.4. EXECUTIA TESTULUI SEMICANTITATIV	6
5.3.5. APRECIEREA REZULTATELOR.....	6
5.3.6. UTILIZAREA TESTULUI TPHA PENTRU PROBE DE LCR	7
5.3.7. VALIDAREA TESTARII.....	7
5.4. LIMITELE TESTULUI.....	7
5.5. SURSE DE EROARE.....	8
6. RESPONSABILITATI.....	8
7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE	8
7.1. FORMULARE / INREGISTRARI	8
7.2. DOCUMENTE CONEXE.....	8
8. ANEXE.....	8

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ	Exemplar nr.
	DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN	Editia:
	TESTUL TPHA	Revizia:
	cod :	Data aplicării:

1. SCOP

Procedura descrie operațiunile necesare pentru execuția testului TPHA, în scopul detectării prezentei anticorpilor antitreponemici în probe biologice, cu trusa « **syphagen TPHA** » **BioKit S.A.**

Principiul testului : hematii de pui sensibilizare cu un extract antigenic de *Treponema pallidum* (Nichols) aglutinează în prezența anticorpilor specifici din serul sau plasma pacienților cu sifilis.

Reacțiile nespecifice sunt detectate prin folosirea hematiilor martor nesensibilizate

Anticorpii față de treponemele nepatogene, comensale, sunt absorbite printr-un extract de treponeme Reiter, inclus în diluentul pentru probe.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplică în diagnosticul sifilisului pentru confirmarea infecției de către personal autorizat în Laboratorul ITS din **I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO**.. Se execută de rutină pe probe de ser și plasma, ocazional se execută pe probe de LCR.

3. DOCUMENTE DE REFERINȚĂ

- 3.1. Manualul Calității cod MC-EM-01
- 3.2. Bench-level Laboratory Manual for Sexually Transmitted Diseases WHO/VDT/89.443
- 3.3. A Manual of Tests for Syphilis, 9th edition, ed. By S.A. Larsen et al., 1998
- 3.4. Ghid de Diagnostic și Tratament al Infecțiilor Transmise Sexual, MSF 2001, București
- 3.5. Prospectul utilizatorului, redactat de producător.

4. DEFINIȚII ȘI PRESCURTĂRI

4.1. Definiții

Test TPHA = test serologic treponemic (specific), confirmă infecția cu *Treponema pallidum*, detectând anticorpii specifici prin reacția de hemaglutinare indirectă.

4.2. Prescurtări

TPHA = *Treponema pallidum* HaemAgglutination

ITS = Infecții cu Transmisie Sexuală

ID/SN = număr de identificare/număr de serie

5. DESCRIEREA ACTIVITĂȚII

5.1. Condiții prealabile

- Temperatura camerei de lucru trebuie să fie de 20-25°C.
- Fiecare lot nou de truse se evaluează comparativ cu lotul anterior. În afara de procedura de control al calității reactivilor, recomandată de producător, se adaugă și testarea unor seruri de reactivitate cunoscută. Dacă se obțin rezultate discrepante (diferența de mai mult de o diluție binară în plus sau minus) lotul nou se respinge.
- Probele de testat trebuie să corespundă din punct de vedere cantitativ (min. 0.5ml) și calitativ. Nu se testează probe de ser ținute mai mult de 5 zile la 2-8°C, probe de plasma ținute mai mult de 72h la 2-8°C sau congelate, probe hemolizate, lipemice, contaminate bacterian/fungic.
- Personalul desemnat să execute testările trebuie să aibă calificarea/experiența necesară.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ	Exemplar nr.
	DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN	Editia:
	TESTUL TPHA	Revizia:
	cod :	Data aplicării:

5.2. Resurse necesare

- Trusa **syphagen TPHA** (reactivi listati in prospectul trusei)
Reactiv antigen = suspensie de hematii de pasăre sensibilizate, gata de folosit
Reactiv martor = suspensie de hematii de pasăre nesensibilizate, gata de folosit
Diluent = solutie de tampon fosfat salin continand continand componente solubile din T.Reiter si agenti de stabilizare
Ser martor pozitiv = ser imun de iepure, prediluat 1/20; titrul este indicat pe eticheta, (o diferenta de o dilutie in plus sau in minus este admisibila)
Ser martor negativ = ser normal de iepure, prediluat 1/20

* Toti reactivii contin < 0.1% azida de sodiu
Precautii : datorita azidei de sodiu, reactivii se arunca la canal sub jet puternic de apa.
Pastrare : reactivii NU se ingheata; raman stabili daca se pastreaza la 2-8°C
- Materiale suplimentare:
 - pipete automate de 20- 200µl (ID) si conuri de prelevare galbene
 - microplăci cu 96 godeuri, fund în U
 - hârtie de filtru
 - vas cu dezinfectant (hipoclorit de sodiu 0.5-1%) /detergent pentru varfurile folosite
 - mănuși latex

5.3. Execuția testului TPHA

Testul se execută pe probe de ser (proba de elecție) sau plasmă, calitativ (diluție standard 1/80) sau semicantitativ (diluții binare începând cu 1/80).

Execuția operațiilor în succesiunea lor, rezultatul verificărilor și calculele necesare se înregistrează în Fișa de Lucru cod F-PS-EM-03-01.

5.3.1. Etape preliminare

- Se pregătește spațiul de lucru pentru executarea procedurii și asigurarea măsurilor de biosiguranță:
Se eliberează locul de obiectele care nu sunt necesare,
Se aduce vasul cu dezinfectant (ex. hipoclorit de sodiu 05-1%) pentru dispenserele și tipsurile folosite ; stative potrivite
- Se scot reactivii, probele, din frigider (+2+8°C) și se lasă în repaus pe masa de lucru 30min.
- Se completează schema de lucru în Fișa de lucru, în funcție de testul cardioliipinic (VDRL respectiv RPR) care se execută pe aceleași probe.

5.3.2. Pregătirea probelor pentru testare

- Se contolează aspectul probelor și, dacă este nevoie, se clarifică prin centrifugare (5min 1200rpm).

5.3.3. Execuția testului calitativ

Pentru fiecare probă sunt necesare 4 godeuri (în sens orizontal) de pe placă de microtitrare

- Se omogenizează suspensiile de hematii sensibilizate și martor (miscare de rotire, fara sa se produca spuma)
- Se execută diluția (exemplu pentru un ser) :

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN TESTUL TPHA	Exemplar nr.
	cod :	Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

- Se pun 25µl diluent in godeul 1, 3 si 4
- Se pun 100µl diluent in godeul 2
- Se adauga 25µl de ser in godeul 1 (dilutie ser 1/2), se amesteca si se transfera 25µl in godeul 2
- Se amesteca bine (dilutie ser 1/10) si in continuare se transfera 25µl in godeul 3 din care, dupa amestecare, se arunca 25µl (dilutie ser 1/20)
- Se transfera alti 25µl din godeul 2 in godeul 4 din care, dupa amestecare, se arunca 25µl (dilutie ser 1/20)
- Pentru martorii de trusa/reactie se repartizeaza, pe alte randuri, in godeurile corespunzatoare (3 si 4) cate 25µl din serurile martor negativ si respectiv martor pozitiv, prediluate 1/20; in alte doua godeuri, in aceeasi pozitie (3 si 4) se repartizeaza 25µl diluent
- Se omogenizeaza din nou, usor, pe rand suspensiile de hematii si se adauga :
- 75µl din suspensia de hematii martor pe verticala in godeurile 3 (si corespunzator pentru toate probele)
- 75µl din suspensia de hematii sensibilizate pe verticala in godeurile 4 (si corespunzator pentru toate probele)

Dilutia finala pentru toate serurile va fi 1/80

- Se agita usor continutul godeurilor 30 sec., batand usor marginile placii
- Placa se acopera cu capacul si se incubeaza la temperatura camerei 45-60min, pe o suprafata plana, departe de orice sursa de caldura sau de vibratie
- Citirea rezultatelor se face macroscopic, notându-se gradul de aglutinare in Fisa de rezultate.

5.3.4. Executia testului semicantitativ

Fiecare test necesita 8 godeuri

- Pregatirea dilutiilor de ser : se porneste de la dil 1/10 ramasa in godeul 2- vezi procedura pentru testul calitativ
 - Se pun cate 25µl diluent in goderile 1-8 (un sir orizontal separat)
 - Se transfera in godeul 1, 25µl din dilutia 1/10 facuta anterior, se amesteca bine si se transfera 25µl in godeul 2, se amesteca si se repeta operatiunile pana la godeul 8, din care se arunca 25µl
 - In paralel se folosesc dilutiile binare de ser martor pozitiv, tinand cont de faptul ca este prediluat 1/20 (in godeul 1 nu se mai adauga diluent)
- Se omogenizeaza suspensia de hematii sensibilizate si se adauga cate 75µl in fiecare godeu 1-8
- Se agita continutul godeurilor 30 sec., batand usor marginile placii
- Placa se acopera cu capacul si se incubeaza la temperatura camerei 45-60min, pe o suprafata departe de o sursa de caldura si evitandu-se orice sursa de vibratie
- Citirea rezultatelor se face macroscopic, notându-se gradul de aglutinare in Fisa de rezultate.

5.3.5. Aprecierea rezultatelor

Citirea martorilor (test calitativ)	Notare	Interpretare
Diluent + hematii sensibilizate	-	Negativ
Diluent + hematii nesensibilizate	-	Negativ
Martor ser pozitiv + hematii sensibilizate	4+	Pozitiv
Martor ser negativ + hematii sensibilizate	-	Negativ
Martori (proba +hematii nesensibilizate)	-	Negativ

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN TESTUL TPHA	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
	cod :	Data aplicării:

Citirea probelor (test calitativ)	Notare	Interpretare
Reteaua de aglutinare acopera tot fundul godeului; marginile pot uneori sa cada spre interior	4+	Pozitiv <u>prezenti anticorpi anti -<i>T.pallidum</i></u> = Infectie activa sau in antecedente
Reteaua de aglutinare acopera partial fundul godeului	3+	
Reteaua de aglutinare este inconjurata de un inel de hematii	2+	
Retea de aglutinare de diametru redus, inconjurata de un inel gros de hematii	1+	
Buton de hematii cu o deschidere in centru	±	La limita nivel de anticorpi scazut sau rezidual (se repeta)
Buton de hematii cu / fara o foarte mica gaura in centru	-	Negativ <u>absenti anticorpi anti -<i>T.pallidum</i></u> (vezi limite test)
Citirea testului semicantitativ		
Titrul aproximativ = cea mai mare dilutie cu rezultat	1+	Pozitiv

5.3.6. Utilizarea testului TPHA pentru probe de LCR

- Dilutii LCR:
 - Dilutia 1/4 = 25µl LCR + 75µl hematii sensibilizate
 - Dilutia 1/20 = 5µl LCR + 20µl diluent + 75µl hematii sensibilizate
- Interpretarea rezultatelor :
Rezultatul este pozitiv numai daca dilutia 1/20 este pozitiva.
Probele care prezinta aglutinare la dilutia 1/20 trebuie repetate in dinamica pentru a se verifica o eventuala evolutie.

5.3.7. Validarea testarii

- Rezultatele testarii se valideaza numai dacă martorii pentru reactivul din kit (diluent, hematii sensibilizate, hematii nesensibilizate, ser negativ, ser pozitiv) dau rezultatele specificate
- Pentru ca rezultatul unui ser să fie validat și interpretabil, nu trebuie să aglutineze hematiile nesensibilizate
- În cazul în care un ser aglutinează hematiile martor, rezultatul testului nu se ia în considerație, se repeta testul pe altă probă sau, de preferat, executarea unui alt tip de test treponemic (ex. FTA-Abs, ELISA).

5.4. Limitele testului

S-au semnalat rezultate fals pozitive pe probe de plasma; pentru repetarea testarilor la probe de plasma initial pozitive sau la limita trebuie sa se foloseasca specimene de ser.

Anticorpii anti-treponemici pot sa persiste perioade lungi de timp, chiar dupa tratament eficient. Din acest motiv pentru evaluarea tratamentului se utilizeaza testele cardiopinicice (RPR / VDRL) semicantitative. Testul TPHA semicantitativ este util doar pentru probabile cazuri de sifilis congenital (a se vedea dg. sifilisului congenital).

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICĂ	Exemplar nr.
	DETECTAREA ANTICORPILOR ANTITREPONEMICI PRIN	Editia:
	TESTUL TPHA	Revizia:
	cod :	Data aplicării:

In principiu, numai cu TPHA nu se poate diferentia între o infecție activă și o infecție tratată sau nu în antecedente; în acest scop este utilă asocierea cu un test cardioliipinic

Datorită faptului că sensibilitatea TPHA în sifilisul recent este mai scăzută cu 4-8% decât a FTA-Abs, pot să apară rezultate fals negative în unele cazuri de infecții primare f.recente.

Testul TPHA poate da reacții încrucișate cu alte forme de infecții treponemice. De asemenea s-au descris rezultate fals pozitive la unele cazuri cu mononucleoza infecțioasă, lepra, tuberculoza, boli autoimune, la persoane aparent sănătoase, după viroze sau care folosesc droguri

5.5. Surse de eroare

Erori de repartizare/pipetare

Contaminarea reactivilor sau mixarea reactivilor din truse diferite.

Nerespectarea condițiilor de păstrare a reactivilor

Utilizarea unor probe lipemice, puternic icterice sau contaminate

Utilizarea unor microplaci necorespunzătoare : cu godeuri zgăriate, defecte sau, refolosite (după spălare)

6. RESPONSABILITATI

Procedura este efectuată de către asistent medical.

Verificarea execuției procedurii este efectuată de către șeful de laborator.

7. FORMULARE / INREGISTRARI, DOCUMENTE CONEXE

7.1. FORMULARE / INREGISTRARI

7.1.1. FIȘĂ LUCRU TEST TPHA TRUSA "syphagen TPHA" Cod :

7.1.2. FORMULAR INREGISTRARE REZULTATE TEST VDRL / RPR/TPHA Cod :

7.2. DOCUMENTE CONEXE

7.2.1. PROCEDURA SPECIFICĂ DE DETECTARE A ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN MICROREAȚIA VDRL Cod :

7.2.2. PROCEDURA SPECIFICĂ DE DETECTARE A ANTICORPILOR ANTICARDIOLIPINICI PRIN TESTUL RPR Cod :

8. ANEXE

Anexa 1. Model FIȘĂ LUCRU TEST TPHA TRUSA "syphagen TPHA" Cod :

Anexa 2. Model FORMULAR INREGISTRARE REZULTATE TEST VDRL / RPR/TPHA Cod

