



KIT DE HEMAGLUTINAÇÃO EM PLACA DE MICROTITULAÇÃO
INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

TPHA Microtitre Plate Kit: para a determinação qualitativa de *Treponema pallidum*.

RESUMO

A sífilis é uma doença venérea causada pelo microrganismo do tipo espiroqueta *Treponema pallidum*. Não é possível cultivar este organismo em meio artificial e, por isso, o diagnóstico de sífilis depende da correlação de dados clínicos com o anticorpo específico demonstrado por testes serológicos. Existem duas técnicas diferentes para a detecção de sífilis. Testes TPHA, que detetam anticorpos contra a *Treponema pallidum*, e testes serológicos não treponema, que detetam uma substância semelhante a um anticorpo, denominada reagina, em pessoas infetadas.

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O reagente é um reagente de teste de látex destinado a ser utilizado para determinar qualitativamente e semiquantitativamente a presença ou ausência de anticorpos contra a *T. pallidum* no soro ou plasma de doentes, quando testado em conformidade com as técnicas recomendadas nestas Instruções de utilização.

PRINCÍPIO

O teste de hemaglutinação para *Treponema Pallidum* (TPHA, *Treponema Pallidum* Hemagglutination) é um teste de hemaglutinação indireto para a detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos específicos contra *T. Pallidum* em soro humano. Eritrócitos de aves estabilizados, sensibilizados com uma solução de *T. Pallidum* antigénica, aglutinam-se na presença de anticorpos contra *T. Pallidum*, apresentando um padrão característico. A não ocorrência de aglutinação indica, geralmente, a ausência dos anticorpos (consulte **LLimitações**).

DESCRIÇÃO DO KIT

O Kit Lorne TPHA deteta anticorpos contra a *T. pallidum*. As células de teste são eritrócitos de aves preservados, revestidos com componentes antigénicos de *T. pallidum* patogénica (estirpe de Nichol). Eventuais reações não específicas são detetadas utilizando as células de controlo; eritrócitos de aves não revestidos com antígenos *T. pallidum*. As reações não específicas também podem ser absorvidas utilizando células de controlo. Anticorpos contra treponemas não patogénicos são absorvidos por um extrato de treponemas de Reiter na suspensão de células. Os reagentes não contêm nem consistem em substâncias cancerígenas, mutagénicas ou tóxicas para a reprodução (CMR), substâncias passíveis de causarem a desregulação do sistema endócrino nem substâncias passíveis de causarem sensibilização ou uma reação alérgica no utilizador. Os reagentes são fornecidos na diluição ideal para utilização com as técnicas recomendadas, sem necessidade de diluição ou acréscimo adicional. Para obter informações sobre o número de referência do lote e o prazo de validade, consulte os **rótulos dos frascos**.

CONSERVAÇÃO

Todos os componentes do kit permanecerão estáveis até ao fim do prazo de validade impresso no rótulo quando armazenados bem fechados a 2–8 °C, e sejam evitadas contaminações durante a utilização dos mesmos. Não congele: reagentes congelados poderão alterar a funcionalidade do teste. Armazene os frascos na posição vertical. A conservação na posição horizontal pode causar a formação de aglomerados celulares. Se a posição for alterada, misture suavemente para dissolver os agregados eventualmente presentes. Deterioração dos reagentes: presença de aglomerados, partículas e turvação.

AMOSTRAS

Soro ou plasma fresco. As amostras mantêm-se estáveis durante 8 dias a 2–8 °C ou durante 3 meses a –20 °C.

As amostras que apresentem fibrina devem ser centrifugadas antes do teste. Não utilize amostras visivelmente hemolisadas ou lipémicas.

PRECAUÇÕES

1. O kit destina-se apenas a utilização em diagnóstico *in vitro*.
2. Não utilize o kit após o prazo de validade (consulte os **rótulos dos frascos e da caixa**).
3. Ao manusear reagentes deve utilizar-se vestuário de proteção, como luvas descartáveis e uma bata de laboratório.
4. Os reagentes contidos neste kit foram processados para reduzir a carga biológica, mas não são fornecidos estéreis. Quando um frasco é aberto, o conteúdo do mesmo deverá manter-se viável até ao fim do prazo de validade.
5. Nenhum teste conhecido pode garantir que os produtos de origem humana ou animal estão isentos de agentes infecciosos. Deve ter-se cuidado na utilização e eliminação de cada frasco e respetivo conteúdo.

ELIMINAÇÃO DE REAGENTES DO KIT E CONTROLO DE DERRAMES

Para obter informações sobre a eliminação de reagentes do kit e a descontaminação de um local afetado por um derrame, consulte a **Ficha de Dados de Segurança**, disponível mediante pedido.

CONTROLOS E RECOMENDAÇÕES

1. Recomenda-se que seja testado um controlo TPHA positivo e um controlo TPHA negativo em paralelo com cada lote de testes. Os testes devem ser considerados inválidos se os controlos não apresentarem os resultados esperados.
2. Todos os reagentes têm de atingir uma temperatura de 18–25 °C antes da utilização.
3. Evite a contaminação dos reagentes ou do soro com saliva, pois isto causará resultados positivos falsos com as amostras.
4. Não troque entre si componentes de diferentes kits.
5. A utilização do kit e a interpretação dos resultados devem ser realizadas por profissionais qualificados e com a devida formação, de acordo com os requisitos em vigor no país onde o kit é utilizado, e o utilizador tem de determinar a adequabilidade do kit para utilização com outras técnicas.

COMPONENTES DO KIT FORNECIDOS

- 1) R1: células de teste (tampa amarela, 1 x 7,5 ml): eritrócitos de aves estabilizados sensibilizados com antígenos de *T. pallidum* (*Nichols*), conservante, pH 7,2.
- 2) R2: células de controlo (tampa verde, 1 x 7,5 ml): suspensão estabilizada de eritrócitos de aves, conservante, pH 7,2.
- 3) R3: diluente TPHA (tampa branca, 2 x 10 ml): solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, extrato de *T. pallidum* (Reiter), conservante.
- 4) Controlo + (tampa vermelha, 1 x 1 ml): soro humano imune pré-diluído no rácio de 1:20, conservante.
- 5) Controlo – (tampa azul, 1 x 1 ml): soro animal, conservante.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- a) Pipetas de precisão.
- b) Placas de microtitulação de poço em “U”.

TÉCNICA QUALITATIVA

1. Deixe que os reagentes e a amostra atinjam a temperatura ambiente.
2. Agite suavemente, mas bem, os frascos de células de teste e de controlo antes da utilização.
3. Dilua a amostra num rácio de 1:20 com diluente (10 µl de soro + 190 µl de diluente (R3)).
4. Pipete para poços adjacentes de uma placa de microtitulação:

	Poço de teste	Poço de controlo
Amostra no rácio de 1:20 ou controlo*	25 µl	25 µl
Células de controlo	--	75 µl
Células de teste	75 µl	--

*Por cada controlo positivo ou negativo ou amostra do doente testado, são necessários 1 poço de teste e 1 poço de controlo.

- Misture bem a placa de microtitulação até obter uma amostra/células homogénea(s).
- Cubra a placa de microtitulação e incube a temperatura ambiente durante 45–60 minutos. Mantenha a placa de microtitulação afastada de vibrações, calor e luz solar direta.
- Examine os padrões de aglutinação das células macroscopicamente.

TÉCNICA SEMIQUANTITATIVA

- Cada amostra requer 8 poços de uma placa de microtitulação, rotulados de A a H.
- Coloque 25 µl de diluente nos poços B a H, inclusive.
- Transfira 25 µl de amostra diluída num rácio de 1:20, na **técnica qualitativa** referida acima, para os poços A e B.
- Retire 25 µl de amostra diluída do poço B e proceda a diluições duplas da amostra dos poços B a H, inclusive, eliminando 25 µl de amostra diluída do poço H.
- Adicione 75 µl de células de teste aos poços A a H, inclusive.
- Agite suavemente a placa de microtitulação para misturar bem os conteúdos.
- Cubra a placa de microtitulação e incube a temperatura ambiente durante 45–60 minutos. Mantenha a placa de microtitulação afastada de vibrações, calor e luz solar direta.
- Examine os padrões de aglutinação das células macroscopicamente.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Leia os resultados comparando os padrões de aglutinação das células de teste com os das células de controlo. As leituras são classificadas e reportadas de acordo com os seguintes critérios:

Grau de hemaglutinação	Leitura	Resultado
Tapete liso de células cobrindo todo o fundo do poço, por vezes com margens dobradas	4+	Reativo
Tapete liso de células cobrindo parte do fundo do poço	3+	Reativo
Tapete liso de células rodeado por um círculo vermelho	2+	Reativo
Tapete liso de células cobrindo menos área e rodeado por um círculo vermelho mais pequeno	1+	Reativo
Botão de células com um pequeno orifício no centro	±	Indeterminado
Botão de células compacto e definido, por vezes com um orifício muito pequeno no centro.	-	Negativo

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

- O controlo negativo não deve apresentar nenhum padrão de aglutinação tanto com as células de teste como com as células de controlo.
- O controlo positivo apenas deve apresentar padrões de aglutinação com as células de teste.
- Qualquer padrão de aglutinação apresentado pelas células de controlo indica a presença de anticorpos não específicos e não pode ser interpretado.
- As amostras com um padrão indeterminado devem ser testadas novamente e reportadas como negativas se o mesmo padrão for reproduzido.
- As amostras reativas devem ser tituladas conforme descrito na técnica semiquantitativa referida acima. O título de soro é definido como a diluição mais elevada que apresenta resultado reativo.
- O diagnóstico clínico não deve basear-se apenas nas conclusões de um único teste, devendo integrar dados clínicos e dados laboratoriais.

LIMITAÇÕES

- Este kit não permite fazer a distinção entre sífilis e outras infeções treponémicas patogénicas, p. ex., frambesia, pelo que devem sempre ser tidas em consideração as evidências clínicas. Recomenda-se que todos os resultados positivos sejam confirmados por um método alternativo, como o FTA-ABS.
- O teste TPHA Syphilis é altamente específico, mas foram descritos resultados positivos falsos com amostras de doentes com mononucleose, lepra, borreliose, doenças autoimunes e toxicod dependentes.
- O teste TPHA não é útil na determinação da eficácia da terapêutica, pois, por vezes, o nível de anticorpos permanece inalterado (o que pode conduzir a um resultado positivo no teste) após a doença ter sido clinicamente curada.
- Podem observar-se resultados positivos falsos ou negativos falsos devido a:
 - Contaminação dos materiais de teste
 - A conservação incorreta dos materiais de teste ou omissão de reagentes
 - Desvio das técnicas recomendadas

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

- O kit foi caracterizado pelos procedimentos mencionados nas **Técnicas recomendadas**.
- Antes da libertação, cada lote do kit Lorne TPHA Syphilis é testado pelas **técnicas recomendadas**, de modo a garantir a reatividade adequada.
- A bilirrubina (≤ 20 mg/dl), a hemoglobina (≤ 10 g/l) os lípidos (≤ 10 g/l) e os fatores reumatóides (≤ 300 UI/ml) não interferem. Outras substâncias podem interferir¹.
- Sensibilidade analítica:** 0,1 UI/ml, conforme testado comparativamente com o 1.º Padrão Internacional para IgG e IgM de Plasma Sifilítico Humano, código NIBSC: 05/132.
- Efeito prozona:** não foi detetado nenhum efeito prozona até títulos de $\geq 1/163840$.
- Sensibilidade de diagnóstico:** 100%
- Especificidade de diagnóstico:** 100%

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

- O utilizador é responsável pelo desempenho dos reagentes quando utilizados em qualquer outro método que não os mencionados em **Técnicas recomendadas**.
- Eventuais desvios devem ser validados antes da utilização de procedimentos laboratoriais estabelecidos.

BIBLIOGRAFIA

- David S. Jacobs et al. Laboratory Test Handbook, 3rd edition, Lexi-Comp Inc, 1994.

APRESENTAÇÕES DISPONÍVEIS DO KIT

Apresentação do kit	Número de catálogo
100 testes por kit	043100A



Lorne Laboratories Limited
Unit 1 Cutbush Park Industrial Estate
Danehill
Lower Earley
Berkshire, RG6 4UT
Reino Unido
Tel.: +44 (0) 118 921 2264
Fax: +44 (0) 118 986 4518
E-mail: info@lornelabs.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta