

Fabricado por: Omega Diagnostics LTD.
 Importado e Distribuído por: BioSys Ltda
 Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
 Cep: 24020-112
 CNPJ: 02.220.795/0001-79
 MS – 10350840051
 Responsável Técnico:
 Vera Lúcia Alves Janoni – CRF: 2848
 SAC: (21) 3907-2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br



IMMUTREP® TPHA ^{Ref} OD071/ OD081

Teste para determinação de anticorpos anti-*Treponema pallidum* por hemaglutinação indireta para diagnóstico sorológico da Sífilis.

Conservar entre 2 - 8°C. Não congelar.

Somente para diagnóstico *in vitro*.

INTRODUÇÃO

A Sífilis é uma doença complexa, geralmente transmitida sexualmente. O *Treponema pallidum* é o agente causador da doença. Este não cresce em meios de cultura convencionais ou mesmo em cultura de tecidos. A infecção é geralmente diagnosticada através da detecção de anticorpos específicos para o *T. pallidum* no sangue ou LCR de pacientes.

Os anticorpos são detectáveis a partir da 3ª a 4ª semana subsequente ao contato com o microorganismo, e podem permanecer em níveis detectáveis por longos períodos após o tratamento. Dois grupos de anticorpos são formados: um grupo que reage com os antígenos não treponêmicos, aqueles usados nos testes VDRL e RPR, e outro grupo que reage com os antígenos específicos do *T. pallidum*. Os anticorpos contra antígenos não treponêmicos encontram-se (geralmente) no estado agudo da doença e os seus níveis diminuem após um tratamento eficaz. Os anticorpos específicos persistem muito tempo após a infecção ter sido tratada com sucesso. É necessário pesquisar ambos os grupos de anticorpos visto que os não treponêmicos podem ser originados por outras infecções que não a Sífilis.

O IMMUTREP TPHA é um teste específico, sensível, por hemaglutinação passiva para a detecção dos anticorpos anti-*T. pallidum* no soro ou LCR.

Apenas para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

O IMMUTREP TPHA é constituído por um reagente de eritrócitos de aves sensibilizados com antígenos e um reagente controle com eritrócitos de aves não sensibilizados, ambos tratados com formol, e um diluente e um soro controle. Quando as amostras positivas diluídas são misturadas com os eritrócitos sensibilizados, a reação antígeno-anticorpo ocorre, provocando a aglutinação das células e formando um padrão característico no fundo do poço da placa de microtitulação. Na ausência de anticorpos, forma-se um botão compacto no fundo do poço.

Este teste foi calibrado com Soro de Referência WHO para teste sorológico para diagnóstico de infecções por *T. pallidum* – Ref. 3-1980 ± uma dupla diluição para assegurar a sensibilidade correta.

CONTEÚDOS (Para 100 ou 200 testes)



Test Cells	8,5ml	2x8,5ml
Hemácias-teste: eritrócitos de aves preservados e revestidos com antígenos de <i>T. pallidum</i> (aprox. 0,36% w/v) em tampão.		
Control Cells	8,5ml	2x8,5ml
Controle de hemácias: eritrócitos de aves preservados (aprox. 0,36% w/v) em tampão.		
DIL.	20ml	2x20ml

Diluente: soro de coelho selecionado (aprox. 0,4%) em tampão.

Control +	1mL	1mL
Soro Controle Positivo: soro pré-diluído (1/20) em tampão contendo anticorpos anti- <i>T. pallidum</i> .		
Control -	1 mL	1mL
Soro controle Negativo: soro pré-diluído (1/20) em tampão sem anticorpos anti- <i>T. pallidum</i> .		
Gotejadores	2	2
Instrução de uso	1	1

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

Placas de microtitulação com poço em U (Dynex M24A) são recomendadas.

Micropipetas para volumes de 10, 25, 75, 100 e 190µL.

PRECAUÇÕES

Os reagentes IMMUTREP TPHA contêm materiais de origem humana que foram testados e confirmados como negativos em relação aos anticorpos anti-HCV, anti-HIV I e anti-HIV II e também HBsAg de acordo com os procedimentos aprovados pela FDA. Nenhum teste pode assegurar que produtos de origem humana não transmitam agentes infecciosos. Por essa razão, os reagentes deverão ser considerados como potencial fonte de contágio e deverão ser manuseados com máximo cuidado e atenção durante o seu uso e quando descartados. Não ingerir.

Os reagentes IMMUTREP TPHA não contêm substâncias perigosas de acordo com a regulamentação de UK Chemicals (*Hazardous Information and Packaging for Supply*). De qualquer modo, todos os reagentes devem ser tratados como contaminantes potenciais durante a utilização e a quando do descarte. O tratamento final aplicado aos reagentes já utilizados deve ser realizado de acordo com a legislação local.

Os reagentes possuem azida sódica 0,095% como conservante e se ingeridos podem ser tóxicos.

A azida de sódio poderá eventualmente reagir com o chumbo e o cobre das canalizações, formando sais fortemente explosivos. Ao descartar os reagentes, recomenda-se a utilização de grandes quantidades de água.

ARMAZENAMENTO

Os kits devem ser armazenados a uma temperatura entre 2°C a 8°C. O kit terá um desempenho de acordo com as especificações durante o período de validade indicado pelo fabricante na embalagem do kit e seus componentes. Não utilizar reagentes após o prazo indicado na embalagem.

Deve-se evitar a exposição dos componentes do kit a temperaturas excessivamente elevadas. Conservar ao abrigo de luz direta.

NÃO CONGELAR NENHUM DOS REAGENTES. Isto pode causar danos irreversíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Obter uma amostra de sangue venoso e após a formação e retração do coágulo, centrifugar para obter uma amostra de soro. É necessário amostras de soro frescos.

Obter uma amostra de LCR do paciente.

Não utilizar amostras de soro hemolisado, contaminado ou lipêmico, pois podem interferir nos resultados.

As amostras de soro devem ser conservadas de 2° C a 8° C por até 48 horas. Para um maior período de conservação, até 01 ano, as amostras devem ser congeladas a -20°C. As amostras que forem descongeladas devem ser homogeneizadas antes da realização do teste.

Não descongelar e congelar as amostras repetidas vezes, pois poderá provocar falsos resultados.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes da realização do teste (20° C - 25° C) e devem ser homogeneizados antes de serem utilizados. Evitar a formação de espuma.

Os gotejadores de eritrócitos são fornecidos para serem utilizados com as suspensões de hemácias-teste e de hemácias-controle.

Esses gotejadores dispensam gotas de 75µl e devem ser colocados nas suspensões correspondentes na seguinte ordem:

- gotejador vermelho = *Test Cells* (Células Teste)
- gotejador branco = *Control Cells* (Célula Controle)

LIMITAÇÕES DO TESTE

A utilização de outras amostras que não soro ou LCR não foram validadas para este teste.

Nenhum teste sorológico por hemaglutinação pode determinar se os anticorpos detectados são referentes à infecção por *T. pallidum* ou originados por outros treponemas patogênicos, como por exemplo, *T. pertenue* e *T. carateum*.

Não foram verificados outros fatores de interferência, contudo os resultados positivos deverão ser confirmados utilizando a técnica FTA-Abs, complementando com os restantes dados clínicos.

Não existe qualquer protocolo de reutilização deste produto.

Um resultado positivo baixo ou suspeito deverá ser confirmado. O diagnóstico não deve ser feito com base unicamente num só resultado. É recomendado levar todos os dados clínicos em consideração.

Este teste poderá ser negativo na fase inicial da Sífilis aguda e na fase tardia da Sífilis latente. Para completar o perfil de resultados e auxiliar o médico no seu diagnóstico, recomenda-se a realização do teste VDRL ou RPR, visto que estes detectam casos ativos de Sífilis. Para este fim, a Omega dispõe de **IMMUTREP USR ANTIGEN** e **IMMUTREP RPR**, respectivamente.

PROCEDIMENTO

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes da realização do teste (20° C - 25° C) e devem ser homogeneizados antes de serem utilizados. As amostras não necessitam de nenhum pré-tratamento.

Abaixo, fornecemos 2 opções para procedimento qualitativo:

PROCEDIMENTO QUALITATIVO TRADICIONAL

Cada teste requer 4 poços de uma placa de microtitulação.

1. Dispensar o diluente na placa de microtitulação da seguinte forma:
 - 25µl nos poços 1, 3 e 4 e 100µl no poço 2.
2. Dispensar 25µl da amostra dentro do poço 1.
 - Homogeneizar e transferir 25µl do poço 1 para o poço 2.
 - Homogeneizar e transferir 25µl do poço 2 para o poço 3.
 - Homogeneizar bem e descartar 25µl do poço 3.
 - Transferir 25µl do poço 2 para o poço 4.
 - Homogeneizar bem e descartar 25µl do poço 4.

Nota: Os controles do kit são pré-diluídos e deverão ser adicionados (25µl) diretamente (não é necessário diluir) nos poços individuais seguintes.

3. Adicionar 75µl do reagente *Control Cells* no poço 3 e agite a placa levemente para homogeneizar.
4. Adicionar 75µl do reagente *Test Cells* no poço 4 e nos poços que contêm os controles. Agite a placa levemente para homogeneizar.
5. As diluições finais dos poços são de 1/80.
6. Tampar e deixar à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos (as placas também poderão ser deixadas em repouso durante a noite).
7. Observar os padrões de aglutinação.

PROCEDIMENTO QUALITATIVO ALTERNATIVO

1. Dispensar 190µl de diluente no poço 1.
2. Adicionar 10µl da amostra no mesmo poço.
3. Homogeneizar bem, retirar 150µl, e descartar.
4. Transferir 25µl do poço 1 para o poço 2.

Nota: Os controles do kit são pré-diluídos e deverão ser adicionados (25µl) diretamente (não é necessário diluir) nos poços individuais seguintes.

5. Adicionar 75µl do reagente *Control Cells* no poço 1 e agite a placa levemente para homogeneizar.
6. Adicionar 75µl do reagente *Test Cells* no poço 2 e nos poços que contêm os controles. Agite a placa levemente para homogeneizar.
7. As diluições finais nos poços são 1/80.
8. Tampar e deixar à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos (as placas também poderão ser deixadas em repouso durante a noite).
9. Observar os padrões de aglutinação.

PROCEDIMENTO QUANTITATIVO

Se tiver intenção de sempre quantificar os resultados positivos, o procedimento qualitativo poderá ser modificado pela omissão do reagente *Control Cells* e pela preparação de apenas uma diluição final. A maioria das amostras será negativa ou nitidamente positiva, e o reagente *Control Cells* deve ser utilizado no processo quantitativo descrito abaixo.

1. Preparar diluições seriadas, numa placa de microtitulação, da seguinte forma:

1.1 Para cada amostra, dispensar 25µl de diluente em cada poço em uma coluna da placa.

Nota: Para diluição de controles deve-se começar a dispensar 25µl a partir da linha 3.

- 1.2 Transferir 25µl do poço 2 da placa do procedimento qualitativo tradicional para o poço 1 da placa do procedimento quantitativo.
- 1.3 Homogeneizar bem e descartar 25µl.
- 1.4 Transferir 25µl do poço 2 da placa do procedimento qualitativo tradicional para o poço 2 da placa quantitativa.
- 1.5 Preparar uma diluição seriada do poço 2 ao poço 8 (para a diluição seriada dos controles deve começar a partir da linha 3)

2. Adicionar 75µl do reagente *Control Cells* no poço 1 e agite a placa levemente para homogeneizar.

3. Adicionar 75µl do reagente *Test Cells* no poço 2 ao poço 8.

4. Agite a placa levemente para homogeneizar.

As diluições finais das amostras nos poços 1 e 2 são de 1/80.

5. Tampar e deixar à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos (as placas também poderão ser deixadas em repouso durante a noite). Observar os padrões de aglutinação.

Nota: Os controles do kit são pré-diluídos e deverão ser adicionados (25µl) diretamente (não é necessário diluir) nos poços 1, 2 e 3 com diluições seriadas começando a partir do poço 3. Não utilizar diluente no poço 1 e 2 e não utilizar o reagente *Control Cells* na avaliação de controles.

RESULTADOS E INTERPRETAÇÃO

Os controles do kit ou amostras com resultados conhecidos devem ser testados a cada corrida de testes. O controle negativo do kit deverá apresentar um resultado negativo ao fim de 45 minutos. O controle positivo do kit deverá apresentar um resultado positivo ao final de 45 minutos. O resultado do teste deverá ser considerado inválido se os níveis de controles ou as amostras conhecidas não apresentarem os resultados esperados.

Procedimento Qualitativo

As hemácias aglutinadas formam uma camada uniforme no fundo dos poços da placa. As **hemácias não aglutinadas** formam um **botão compacto** no centro do poço da placa. As hemácias fracamente aglutinadas formam um padrão característico em forma de anel. A presença de aglutinação com o reagente *Test Cells* e a sua ausência com o reagente *Control Cells* indicam a presença de anticorpos específicos **anti-*Treponema pallidum***. A ausência de aglutinação indica que os anticorpos, se presentes, encontram-se em quantidades inferiores ao limite de detecção do teste. Não utilizar o resultado padrão encontrado com o reagente *Control Cells* como referência para resultados negativos, pois o mesmo fornece um botão de células mais compacto.

A ocorrência de aglutinação com o reagente *Control Cells* e com o reagente *Test Cells* é indicativa da presença de anticorpos anti-hemácias. Neste caso, o teste não poderá ser considerado válido e deverá ser repetido após a absorção do soro.

Para realizar esta operação é necessário fazer uma diluição de soro a 1/4 com o reagente *Control Cells* e deixar em repouso 45 a 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugar (1000 rpm durante 5 minutos) e diluir o sobrenadante 1/5 em diluente. Testar essa amostra diretamente, sem qualquer diluição adicional, utilizando as suspensões *Test Cells* e *Control Cells*. O teste FTA ABS é recomendado como método de confirmação.

Procedimento Quantitativo

O título é a maior diluição que ainda apresentar aglutinação. O controle positivo deve originar um título a cerca de uma dupla diluição de 1/2560. A diluição de partida para o método quantitativo é de 1/80. Títulos de 1/164000 foram detectados com **IMMUTREP TPHA** sem efeito prozona (Hook).

RECOMENDAÇÕES

Os testes de hemaglutinação são sensíveis aos efeitos do calor, da luz direta do sol e da vibração. Manter afastado destas fontes durante os períodos de incubação do teste.

Não deixar que as amostras ou os reagentes sejam contaminados por saliva visto que poderá causar resultados falsos.

Utilizar uma pipeta descartável para cada amostra de modo a evitar contaminações.

Fechar todos os reagentes imediatamente após o seu uso.

Não deixar que os reagentes escorram nas laterais dos poços. Os componentes do kit deverão estar à temperatura ambiente antes de se iniciar o teste (20° C - 25° C). Misturar cuidadosamente os reagentes usando movimentos circulares ou invertendo os frascos.

O kit deve ser manuseado apenas por pessoal qualificado.

Não utilizar componentes do kit danificados ou contaminados.

Não utilizar componentes de outros kits.

AVALIAÇÃO

Foram testadas amostras, em um centro Europeu de referência. Essas amostras eram originárias de *Antenatal Clinics, Genito – Urinary Medical Clinicals and Public Health Laboratories*.

Resultados obtidos:

	Amostras Positivas	Amostras Negativas	Total
Sífilis Positiva	406	6	412
Sífilis Negativa	3	669	672
	409	675	1084

Este estudo revelou que o kit IMMUTREP TPHA apresenta:

Sensibilidade de 98,5%

Especificidade de 99,6%

A reprodutibilidade do **IMMUTREP TPHA** foi de 100% (± uma diluição 1/2).

GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS

Seguir as disposições da resolução sobre o regulamento técnico para gerenciamento de resíduos de serviços de saúde bem como outras práticas de biossegurança equivalentes, revisão em vigor.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e do estojo.

REFERÊNCIAS

1. **Tomizawa, T. and Kasamatsu, S.** Jap. J. Med. Sci. Biol. 19,305 (1966).
2. **Rathlev, T.,** Brit. J. Vener. Dis., 43,181 (1967).
3. **Tringali, G.,** Ann. Sc. Pav., 12,311 (1970).
4. **Uete, T., Fukazawa., S., Ogi. K. and Takeuchi, Y.,** Brit., J. Vener. Dis., 47,73 (1971)
5. **Garner, M.F., Backhouse, J. L, Daskalopoulos, G. and Walsh, J.L.,** 48,474 (1972)
6. **Johnston, N.A.,** Brit. J. Vener. Dis. 1972, 48,474 (1972)
7. **Sequeira, P.J.L. and Eldridge, A. E.,** Brit. J. Vener. Dis. 43,242 (1973)
8. **Lensinski, J., Krach, J. and Kadziewics, E.,** Brit. J. Vener. Dis. 50, 33 (1974)
9. **O'Neill, P., Warner, R.W. and Nicol, C.S.,** Brit. J.Vener. Dis. 49,427 (1973)
10. **Young, H., Henrischen, C. and Robertson, D.H.H.,** Brit. J. Vener. Dis. 50,341 (1975)

8003A Issue 5 Revised January 2012/BS Rev00 ago/2012



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
 Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
 od@omegadiagnostics.co.uk
 www.omegadiagnostics.co.uk
 AN ISO 9001:2000 CERTIFIED COMPANY