

MS 10310030074

# Imuno-HAI

# TPHA

*Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-Treponema pallidum no soro e plasma humano por hemaglutinação indireta.*

**CÓD. 35096-H: 96 determinações**

**CÓD. 35192-H: 192 determinações**



**WAMA Diagnóstica**

Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT  
CEP 13560-971 - São Carlos - SP

Fone (16) 3377.9977 / Fax (16) 3377.9970  
[www.wamadiagnostica.com.br](http://www.wamadiagnostica.com.br)

## IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A sífilis é uma doença infecciosa humana produzida por um espiroqueta, o *Treponema pallidum*. Ela é principalmente uma doença transmitida sexualmente. Outras possíveis vias de transmissão são a transfusão de sangue infectado, hoje praticamente eliminada através de triagem sorológica de rotina, e a perinatal (sífilis congênita) transmitida *in útero*, pelos treponemas procedentes da mãe infectada para o feto em desenvolvimento.

Clinicamente, após um período de incubação que varia de 10 a 90 dias, pois é inversamente relacionado com a quantidade do inoculado, ocorre, em 85% dos pacientes, o surgimento de um cancro, que é uma lesão solitária e indolor, caracterizando a sífilis primária. Aproximadamente 4 a 10 semanas após o aparecimento do cancro, surgem freqüentemente sintomas como perda de peso, cefaléia, anorexia, mialgia, artralgia, mal-estar, febre baixa, linfadenopatia generalizada e exantema (presente em 75 a 100% dos casos), o que caracteriza a sífilis secundária. Podem ocorrer também neste estágio manifestações de comprometimento do sistema nervoso central. Após as manifestações primárias ou secundárias, ocorre o período conhecido como sífilis latente, caracterizado por testes sorológicos positivos e ausência de achados clínicos. Pode ter duração de 1 a 2 anos. Sem tratamento, cerca de um terço dos pacientes apresenta sífilis terciária, que pode manifestar-se como goma (15%), sífilis cardiovascular (10%) ou neurosífilis (8 a 10%).

Os testes sorológicos para sífilis são classificados como não-

treponêmicos, usados mais comumente para a triagem, como o **VDRL** (*Veneral Disease Research Laboratory*) e o **RPR** (*Rapid Plasma Reagin*), e treponêmicos, usados como testes confirmatórios para os soros reativos nos testes de triagem, como o **TPHA** (*Treponema pallidum Hemagglutination*), **FTA-Abs** (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*) e **ELISA** (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

O teste de hemaglutinação para *Treponema pallidum* é também bastante sensível e tem a vantagem de ser de fácil realização.

## **PRINCÍPIO DO MÉTODO**

Eritrócitos estabilizados de aves, sensibilizados com componentes antigênicos do *Treponema pallidum* altamente purificados, mostram aglutinação quando reagem com anticorpos contra esses antígenos presentes no soro, plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de sífilis.

Anticorpos inespecíficos provenientes de Treponemas saprófitas que poderiam causar resultados falso-positivos são absorvidos por componentes presentes no diluente estabilizador das hemácias sensibilizadas.

## **APRESENTAÇÃO DO KIT**

**CÓD. 35096-H** (96 determinações qualitativas)

1. Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Treponema pallidum* (1 x 5ml)

2. Solução diluente (1 x 40ml)
3. Soro controle positivo (1 ml)
4. Soro controle negativo (1 ml)
5. Placa de microtitulação descartável com fundo em “V” (1 x 96 cavidades)
6. Instruções para uso

**CÓD. 35192-H** (192 determinações qualitativas)

1. Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Treponema pallidum* (2 x 5ml)
2. Solução diluente (2 x 40ml)
3. Soro controle positivo (1 ml)
4. Soro controle negativo (1 ml)
5. Placa de microtitulação descartável com fundo em “V” (2 x 96 cavidades)
6. Instruções para uso

**PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES**

**SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS (1):** pronta para uso. Estável até a data do vencimento se conservada entre 2-8°C. **Não congelar.** Homogeneizar bem antes do uso, sempre com movimentos circulares do frasco entre as mãos e por inversão do frasco, mas nunca por agitação, pois esta pode acarretar hemólise e/ou autoaglutinação. Antes de serem usadas, deixar em temperatura ambiente.

**SOLUÇÃO DILUENTE (2):** pronta para uso. Deixá-la em temperatura ambiente antes de utilizá-la. Contém azida sódica

0,1%. Estável entre 2-8°C.

**SORO CONTROLE POSITIVO (3):** pronto para uso. Estável entre 2 - 8°C.

**SORO CONTROLE NEGATIVO (4):** pronto para uso. Estável entre 2 - 8°C.

## **AMOSTRAS**

Usar soro ou plasma frescos ou conservados a -20°C (máximo de 4 a 6 semanas) de pacientes em jejum. As amostras devem estar em temperatura ambiente antes do uso e não necessitam de qualquer tratamento prévio. Não usar soro hemolisado, contaminado ou lipêmico. Líquor cefalorraquidiano pode ser usado como amostra.

## **MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO**

- Tubos de ensaio para diluição e titulação
- Pipetas sorológicas
- Estante para tubos e rack de ponteiras
- Recipiente para descarte de material.

## **PROCEDIMENTO**

### **A. Teste qualitativo**

1. Colocar a placa sobre um pano úmido para neutralizar as forças eletrostáticas.
2. Usar 1 cavidade da placa por amostra, incluindo sempre os controles positivo e negativo.
3. Diluir em tubo de ensaio: 390µl do diluente (2) + 10µl da amostra (diluição 1/40).

4. Pipetar 50 $\mu$ l do controle positivo (3) e do controle negativo (4) nas cavidades A1 e A2, por exemplo (ATENÇÃO: NÃO DILUIR OS SOROS CONTROLES. ESTES CONTROLES SÃO FORNECIDOS PRONTOS PARA USO). Pipetar 50 $\mu$ l da diluição 1/40 de cada amostra nas respectivas cavidades da placa.
5. Adicionar 50 $\mu$ l da suspensão homogênea de hemácias (1) em cada cavidade, o que corresponde a uma diluição da amostra (soro desconhecido) a 1/80.
6. Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placas) ou batendo, com os dedos, nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.
7. Deixar em repouso por exatamente 1 hora em temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE).
8. Fazer leitura.

## LEITURA

**Reação Negativa:** quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade formando um botão.

**Reação Positiva:** quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade como um tapete, às vezes com bordas irregulares.

## INTERPRETAÇÃO

A presença de aglutinação na suspensão de hemácias indica a presença de anticorpos específicos anti-*Treponema pallidum*. A ausência de aglutinação indica a ausência de anticorpos específicos anti-*Treponema pallidum* ou que estes

existem abaixo do limite de detecção do teste.

**NOTA:** O teste de hemaglutinação associado a outras técnicas, como imunofluorescência e/ou ELISA possibilita a confirmação do teste.

### **B. Teste quantitativo**

1. Preparar diluição da amostra a 1/40, conforme item 3 do teste qualitativo.
2. Pipetar 100 $\mu$ l da diluição 1/40 da amostra na cavidade A1 da microplaca.
3. Pipetar 50 $\mu$ l do diluente de amostras nas cavidades B1 a H1.
4. Transferir 50 $\mu$ l da cavidade A1 para a cavidade B1, com auxílio de pipeta automática, homogeneizando várias vezes. Transferir 50 $\mu$ l da cavidade B1 para a cavidade C1 e assim sucessivamente até a cavidade H1. Descartar 50 $\mu$ l da última cavidade.
5. Pipetar 50 $\mu$ l da suspensão de hemácias sensibilizadas devidamente homogeneizadas em todas as cavidades contendo amostras. Após a adição das hemácias teremos diluições de 1/80 (A1) até 1/10240 (H1).
6. Agitar suavemente a placa por vibração mecânica ou batendo com os dedos nas bordas da placa durante 3 a 4 minutos.
7. Deixar em repouso por exatamente 1 hora em temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE).
8. Fazer a leitura das cavidades.

**TÍTULO DA AMOSTRA:** Maior diluição que mostra uma

## PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Não utilizar reagentes de lotes diferentes.
2. Ao deixar as placas em repouso, estas não devem sofrer vibrações, pois prejudica a qualidade da leitura.
3. O frasco de hemácias deve ser armazenado em posição vertical correta para evitar auto-aglutinação irreversível.
4. **USAR EXCLUSIVAMENTE A PLACA DO KIT**, que não deve ser reutilizada.
5. São aceitáveis variações de 1 ou 2 títulos para um mesmo soro nas reações de hemaglutinação.
6. Nenhum teste sorológico por hemaglutinação pode discriminar anticorpos devido a infecção por *Treponema pallidum* dos anticorpos devido a infecção com outros treponemas patogênicos, como o *T. pertenue* e *T. carateum*.
7. Recomenda-se que todos os resultados positivos sejam confirmados pelo método FTA-Abs, kit **Imuno-Con Sífilis (FTA-Abs)** da **WAMA**.
8. O teste pode ser negativo em sífilis ativa precoce ou em sífilis latente tardia. Para completar o perfil de resultados para ajudar aos clínicos no diagnóstico da sífilis recomenda-se o uso de **VDRL** ou **RPR**. A **WAMA** dispõe do **VDRL** e **RPR** (Reaginas).
9. Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e anti-HCV, porém, como nenhum método

diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles humanos como materiais potencialmente infecciosos.

10. Não congelar os reagentes.

11. Como se emprega azida sódica a 0,1% como conservante, além de tóxica quando ingerida, o descarte dos reagentes deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, podendo formar sais altamente explosivos.

12. Seguir as Boas Práticas Laboratoriais (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

## SIMBOLOGIA



O conteúdo é suficiente para ( n ) testes



Data limite de utilização



Limite de temperatura



Consultar instruções para uso



Produto diagnóstico *in vitro*



Número do lote



Número do catálogo



Proteger do calor

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bhattacharyya, M.N.: Serological tests for syphilis. **Br. Med. J.**, 285: 973, 1982.
2. Larsen, .; Hambie, E.A.; Pettit, D.E.; Perryman, M.W.; Kraus, S.J.: 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.*, 14(4): 441-45, 1981.
3. Larsen, S.A.; Steiner, B.M.; Rudolph, A.H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 1-21. 1995.
4. Luger, A.: Diagnosis of syphilis. **Bull. World Health Organ.**, 59(5): 647-654, 1981.
5. Thakar, Y.; Chande, C.; Mahalley, A.D.; Saoji, A.M. Seroprevalence of syphilis by TPHA test. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 39 (2) 135-138.1996.
6. Rathlev, T. Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the sero-diagnosis of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* 43(3): 181-185. 1967.

**V EDIÇÃO - Revisão: 08/2007**

## **TERMO DE GARANTIA**

A **WAMA Diagnóstica** garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A **WAMA** e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.