

Imuno-HAI TPHA

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

An indirect hemagglutination kit for the qualitative and semi-quantitative detection of anti-*Treponema pallidum* antibodies in human serum and plasma.

Kit para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* en el suero y plasma humano por hemoaglutinación indirecta.

REF 35096-H: 96 determinações / determinations / determinaciones

REF 35192-H: 192 determinações / determinations / determinaciones



WAMA Diagnóstica
Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13560-971 - São Carlos - SP - Brasil
Fone 55 16 3377.9977 / Fax 55 16 3377.9970
www.wamadiagnostica.com.br
OBELIS SA
Avenue de Tervueren, 34 bte 44, 1040
Brussels - Belgium / www.obelis.net

PORTUGUÊS

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 frequentemente 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

Eitricócitos estabilizados de aves, sensibilizados com componentes antigênicos do *Treponema pallidum* altamente purificados, mostram aglutinação quando reagem com anticorpos contra esses antígenos

presentes no soro e plasma de pacientes com suspeita de sífilis. Anticorpos inespecíficos provenientes de *Treponema* saprófitas que poderiam causar resultados falso-positivos são absorvidos por componentes presentes no diluente estabilizador das hemácias sensibilizadas.

APRESENTAÇÃO DO KIT

REF 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 (1ml)
4. Soro controle negativo (1ml)
5. Placa de microtitulação descartável com fundo em "V" (1 x 96 cavidades)
6. Instruções para uso

REF 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 (1ml)
4. Soro controle negativo (1ml)
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 0,095%. Estável entre 2 -8°C.

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

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

Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização, e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que mantido na temperatura indicada (2-8°C).

AMOSTRAS

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

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Tubos de ensaio para diluição e titulação
- Pipetas sorológicas
- Estante para tubos e rack de poiteiras
- 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 (diluente 1/40).

4. Pipetar 50µl 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 50µl da diluição 1/40 de cada amostra nas respectivas cavidades da placa.

5. Adicionar 50µl 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 semi-quantitativo

1. Preparar diluição da amostra a 1/40, conforme item 3 do teste qualitativo.

2. Pipetar 100µl da diluição 1/40 da amostra na cavidade A1 da micropalca.

3. Pipetar 50µl do diluente de amostras nas cavidades B1 a H1.

4. Transferir 50µl da cavidade A1 para a cavidade B1, com auxílio de pipeta automática, homogeneizando várias vezes. Transferir 50µl da cavidade B1 para a cavidade C1 e assim sucessivamente até a cavidade H1. Descartar 50µl da última cavidade.

5. Pipetar 50µl 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 reação positiva. O ponto final é quando o tapete de hemácias cobre 50% do fundo da cavidade.

DESEMPENHO DO TESTE

Sensibilidade: 100% de sensibilidade - Em 95 amostras, do controle de qualidade, sabidamente positivos, foram comparadas e confirmadas. Todos os resultados foram satisfatórios, não apresentando falso-negativos.

Especificidade: 99,7% de especificidade - Em 275 amostras, do controle de qualidade, sabidamente negativos foram comparadas e confirmadas, apresentando 1 amostra com falso-positivo.

Precisão:

Intra-ensaio: Foram usadas duplicata de 10 amostras para avaliação da precisão dentro do ensaio. Os valores negativos e positivos foram corretamente identificados em 100% das vezes.

Inter-ensaio: Usando as mesmas 10 amostras foram realizados ensaios independentes com três diferentes lotes por um período de 3 dias. Os valores negativos e positivos foram corretamente identificados em 100% das vezes.

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 a materiais potencialmente infecciosos.

10. Não congelar os reagentes.

11. Como se emprega azida sódica a 0,095% 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. Descartar o material conforme regulamentações locais.

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

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.

ENGLISH

SUMMARY

Syphilis is human infectious disease caused by a spirochete bacterium, *Treponema pallidum*. It is a sexual transmitted disease. Other possible routes of transmission are infected blood transfusion and perinatal (congenital syphilis) from mother to child in utero. Primary syphilis is manifested after an incubation period of 10-90 days. During the initial incubation period, patients are asymptomatic. The sore, called a chancre, is a firm, painless skin ulceration occurring in 85% of patients.

Secondary syphilis is characterized after 4 to 10 weeks after primary infection. The most common symptoms are weight loss, headache, anorexia, myalgia, arthralgia, malaise, fever, lymph nodes and exanthem, occurring in 75 to 100% of patients. In this phase, central nervous system can also be affected. Latent syphilis is after the primary and secondary stages and is characterized by positive serological tests and the absence of clinical findings. This stage can last 1 to 2 years. Tertiary syphilis is manifested in one third of patients without treatment and can present gumma (15%), cardiovascular syphilis (10%) or neuro-syphilis (8-10%). Serological tests for syphilis are classified as non-treponema, for screening, such as VDRL (Veneral Disease Research Laboratory) and RPR (Rapid Plasma Reagin) and treponemal tests, used as confirmatory tests for reactive serum in screening, such as TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination), FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) and ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Hemagglutination test for *Treponema pallidum* is sensitive and easy to use.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Stabilized fowl erythrocytes sensitized with highly purified *Treponema pallidum* antigens reveal agglutination when react with antibodies against these antigens present in serum or plasma, from patients with suspect of syphilis.

Non-specific antibodies, from treponemal saprophyte that could present false positive results, are absorbed by components in the stabilizer diluent of sensitised erythrocytes.

KIT PRESENTATION

REF 35096-H (96 qualitative tests)

1. Erythrocytes suspension sensitised with components of *Treponema pallidum* (1x5ml)
2. Diluent solution (1x40ml)
3. Positive control serum (1ml)
4. Negative control serum (1ml)
5. Disposable "V"-well microtitration plates (1x96)
6. Instructions for use.

REF 35192-H (192 qualitative tests)

1. Erythrocytes suspension sensitised with components of *Treponema pallidum* (2x5ml)
2. Diluent solution (2 x 40ml)
3. Positive control serum (1ml)
4. Negative control serum (1ml)
5. Disposable "V"-well microtitration plates (2x96)
6. Instructions for use.

REAGENT STABILITY AND STORAGE

• **ERYTHROCYTES SUSPENSION (1):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. **Do not freeze.** Homogenize before using it, always in circular movements and for vial inversion but never shake, since this movement can induce to haemolysis and/or agglutination. Allow the suspension to reach room temperature prior to use.

• **DILUENT SOLUTION (2):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C. Allow the components to reach room temperature prior to use. It contains Sodium azide 0.095%.

• **POSITIVE CONTROL SERUM (3):** Ready for use. Stable if stored at 2 to 8°C.

• **NEGATIVE SERUM CONTROL (4):** Ready for use. Stable if stored at 2 to 8°C.

The kit presents good performance after being used for the first time. It is stable up to the expiration date if store at 2-8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Fresh serum or plasma from patients or stored at -20°C (4 to 6 weeks) should be used. The specimen should reach to room temperature prior to use. Do not use haemolysed, contaminated or lipaemic specimen.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Test tubes for dilution and titration
- Serological pipettes
- Shelf for tubes and rack for tips
- Container for discarded material

PROCEDURE

A. Qualitative test

1. Lay the plate onto a humid piece of cloth to avoid electrostatics.
2. Use 1 well of the plate for specimen, including positive and negative controls.

- Dilute in the test tube: 390 μ l of diluent (2) + 10 μ l of specimen (dilution at 1:40).
- Add 50 μ l of positive control (3), negative control (4) in the A1 and A2 wells, for example. (ATTENTION: DO NOT DILUTE THE CONTROLS. THEY ARE READY FOR USE). Add 50 μ l of the dilution at 1:40 of each specimen in the respective wells of the plate.
- Add 50 μ l of the homogeneous suspension of erythrocytes (1) on each well, which correspond to one dilution of the specimen (unknown serum) at 1:80.
- Shake the plate by mechanical vibration (plate agitator) or beat the fingers on the edges of the plate for 3 to 4 minutes.
- Let stand for 1 hour at room temperature in a place free of vibration (IMPORTANT).
- Interpret the results.

RESULTS

Negative: Red cells gather in the bottom of the well and form a button.

Positive: Red cells gather in the bottom of the well and form a rug, sometimes it shows irregular edges.

INTERPRETATION

The agglutination of test cells indicates the presence of specific antibody to anti- **Treponema pallidum**. The absence of agglutination indicates the absence of specific antibody to anti-**Treponema pallidum** or antibody is below the limit of detection of the system.

NOTE: Hemagglutination test associated with other methods such as immunofluorescence and/or ELISA are recommended as confirmatory tests.

B. Semi-Quantitative test

- Dilute the specimen at 1:40 as per step 3 of the qualitative test.
- Add 100 μ l of the specimen diluted at 1:40 in the well A1 of the plate.
- Add 50 μ l of the diluent solution in the wells B1 to H1 of the plate.
- Transfer 50 μ l from the well A1 to the well B1 by using the automatic pipette and mix gently. Transfer 50 μ l from well B1 to well C1 and so on up to well H1. Discard 50 μ l of the last well.
- Add 50 μ l of the suspension of erythrocytes in all wells which contain specimens. The dilutions vary from 1:80 (A1) to 1:10240 (H1).
- Shake the plate by mechanical vibration (plate agitator) or beat the fingers on the edges of the plate during 3 to 4 minutes.
- Let stand for 1 hour at room temperature in a place free of vibration (IMPORTANT).
- Interpret the results.

TITER OF THE SPECIMEN: The highest dilution which shows a positive reaction. The end point is when the erythrocytes cover 50% of the bottom of the well.

PERFORMANCE OF THE TEST

Sensitivity: 100% of sensitivity - 95 in-house positive specimens from the quality control were compared. All results were satisfactory. False negative results were not found.

Specificity: 99,7% of specificity - 275 in-house negative specimens from the quality control were compared. It was found one false positive result.

Precision: Intra-assay: The precision was verified using 10 replicas of 10 specimens. The negative and positive results were correctly identified at 100% of the times.

Inter-assay: The precision was verified using 10 replicas of 10 specimens against independent assay with 3 different lots during a period of 3 days. The negative and positive results were correctly identified at 100% of the times.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- Do not use reagents from different lots.
- The plates should be free of vibration since it can affect the interpretation of the results
- The vial of the erythrocytes should be stored in vertical position to avoid irreversible auto-agglutination.
- USE EXCLUSIVELY THE KIT PLATE. It should not be reused.
- Variations of 1 or 2 titers are acceptable for the same serum on hemagglutination reactions.
- No serological test through hemagglutination method can distinguish antibodies due to **Treponema pallidum** infection because of other pathogenic treponemal infections such as **T. pertenuae** and **T. Carateum**.
- A confirmatory FTA Abs test is also recommended, kit **Imuno ConSifilis (FTA-Abs)** from **WAMA**.

8. Test can be negative in early active syphilis or later latent syphilis. To complete and aid the syphilis diagnostic, it is recommended the use of **VDRL** or **RPR**. **WAMA** markets both tests, **VDRL** and **RPR** (Reagins).

9. All human components have been tested for anti-HCV, anti-HIV and HBsAg and found negative. However, this does not assure the absence of these and other infectious diseases. All human components should be handled as potentially hazardous.

10. Do not freeze the reagents.

11. Sodium azide 0.095% is used as preservative. It can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon

disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide is toxic if ingested.

12. Disposal in accordance with local regulations.

13. Follow the good laboratory practices (GLP) related to storage, handling and material disposal.

WARRANT

WAMA Diagnóstica replaces this kit since it is not beyond expiration date. The returned kit must be evaluated by Wama's technical support. The warranty will be invalid and kit will not be replaced if technical support finds evidence that running, handling and storage were not properly followed.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

La sífilis es una enfermedad infecciosa humana producida por un espiroqueta, el *Treponema pallidum*. Ella es principalmente una enfermedad transmitida sexualmente. Otras posibles vías de transmisión son la transfusión de sangre infectado, hoy prácticamente eliminada a través de la selección serológica de rutina, y la perinatal, la sífilis congénita, transmitida in útero, por los treponemas procedentes de la madre infectada para el feto en desarrollo. Clínicamente después de un período de incubación que varía de 10 a 90 días, pues es inversamente relacionado con la cantidad de inculcado, ocurre, en 85%, el surgimiento de un cancro, que es una lesión solitaria y indolora, caracterizando a la sífilis primaria.

Aproximadamente 4 a 10 semanas después del apareamiento del cancro, surgen frecuentemente síntomas como la pérdida de peso, cefaleas, anorexia, mialgia, artralgia, mal-estar, poca fiebre, linfadenopatía generalizada y exantema (presente en 75% a 100% de los casos), lo que caracteriza la sífilis secundaria. Pueden ocurrir también en este estágio manifestaciones de comprometimiento del sistema nervioso central. Después de las manifestaciones primarias o secundarias, ocurre el período conocido como sífilis latente, caracterizado por los tests serológicos positivos y la ausencia de hallados clínicos. Pueden tener duración de 1 a 2 años. Sin tratamiento, cerca de un tercio de los pacientes presenta sífilis terciaria, que puede manifestarse como goma (15%), sífilis cardiovascular (10%) o neurosífilis (8 a 10%).

El tests serológicos para sífilis son clasificados como no-treponémicos, usados más comúnmente para la selección, como VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) y el RPR (Rapid Plasma Reagin), y treponémicos, usados como tests de selección, como el TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination) y el FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) y ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

El teste de hemagglutinación para *Treponema pallidum* es bastante sensible y tiene la ventaja de ser de fácil realización.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Eritrocitos de aves estandarizadas, sensibilizados con componentes antigénicos del *Treponema pallidum* altamente purificados, muestran aglutinación cuando reaccionan con anticuerpos contra esos antígenos presentes en el suero y plasma.

PRESENTACIÓN DEL KIT

REF 35096-H (96 tests cualitativos)

- Suspensión de hemáticas sensibilizadas con componentes del *Treponema pallidum* (1x5ml)
- Solución diluyente (1x40ml)
- Suero control positivo (1ml)
- Suero control negativo (1ml)
- Placa de micro titulación desechable con fondo en "V" (1x96 cavidades)
- Instrucción para el uso

REF 35192-H (192 tests cualitativos)

- Suspensión de hemáticas sensibilizadas con componentes del *Treponema pallidum* (2x5ml)
- Solución diluyente (2x40ml)
- Suero control positivo (1ml)
- Suero control negativo (1ml)
- Placa de micro titulación desechable con fondo en "V" (2x196 cavidades)
- Instrucciones para el uso

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

- Suspensión de hemáticas sensibilizadas (1): lista para uso. Estable hasta la fecha de caducidad si se conserva entre 2-8°C. No congelar. Homogeneizar bien antes del uso, siempre con movimientos circulares del frasco entre las manos y por inversión del frasco, pero nunca poner en agitación, pues esta puede acarrear hemólisis y/o aglutinación. Antes de ser usadas, dejar en temperatura ambiente.

- Solución diluyente (2): lista para el uso. Dejar en temperatura ambiente antes de utilizarla. Contiene azida sódica 0,095%. Estable entre 2-8°C.

- Suero control positivo (3): listo para el uso.

- Suero control negativo (4): listo para el uso.

Obs.: El kit mantiene el mismo desempeño después del primer uso, y es estable hasta la fecha de caducidad desde que sea mantenido en la

temperatura de 2-8°C.

MUESTRA

Usar sueros frescos de pacientes conservados a -20°C (máximo de 4 a 6 semanas). No usar plasma como muestra. Las muestras deben ser en temperatura ambiente antes del uso y no necesitan de cualquier tratamiento previo. No usar suero hemolisado, contaminado o lipéico.

MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO

-Tubos de ensayo para la dilución y titulación

-Pipetas suerológicas

-Estante para tubos y rack de punteras

-Recipiente para el descarte de material.

PROCEDIMIENTO

A. Teste cualitativo

- Colocar la placa sobre un paño húmedo para neutralizar las fuerzas electrostáticas.
- Usar 1 cavidad de la placa por muestra, incluyendo siempre los controles positivos y negativo.
- Diluir en el tubo de ensayo: 390 μ l de diluyente (2) + 10 μ l de la muestra (dilución 1/10)
- Pipetar 25 μ l del control positivo(3) y del control negativo(4) en las cavidades A1 y A2, por ejemplo. En las cavidades siguientes (A3, A4, A5...) pipetar 25 μ l de la solución diluyente (2) para cada muestra a ser testada. Transferir 25 μ l de la dilución 1/10 de cada muestra para las respectivas cavidades de la placa (lo que corresponde a una dilución 1/20). Homogeneizar, retirar 25 μ l y despresar.
- Añadir 75 μ l de suspensión homogénea de hemáticas (1) en cada cavidad.
- Agitar la placa por la vibración mecánica (agitador de placas) o golpeando, con los dedos, en las bordas de las placas por 3 a 4 minutos.
- Dejar en reposo por 1 hora en temperatura ambiente, en local libre de vibraciones (Importante).
- Hacer la lectura.

LECTURA

Reacción negativa: cuando las hemáticas se depositan en el fondo de la cavidad formando un botón.

Reacción positiva: cuando las hemáticas se depositan en el fondo de la cavidad como una alfombra, las veces con bordas irregulares.

INTERPRETACIÓN

La presencia de aglutinación en la suspensión de hemáticas indica la presencia de anticuerpos específicos anti-*Treponema pallidum*. La ausencia de aglutinación indica la ausencia de anticuerpos específicos anti-*Treponema pallidum* lo que está existiendo abajo del límite de detección del teste.

Nota: el teste de hemagglutinación asociado a otras técnicas, como inmunofluorescencia y/o ELISA posibilita la confirmación del teste.

B. Teste semi-cuantitativo

- Preparar dilución de la muestra de 1/40, conforme ítem 3 del teste cualitativo.
- Pipetar 100 μ l de dilución 1/40 de la muestra para cavidad A1 de la placa.
- Pipetar 50 μ l del diluyente de amuestras para la cavidades B1 hasta H1.
- Transferir 50 μ l de la cavidad A1 para la cavidad B1, con la ayuda de una pipeta automática, homogeneizar bien. Transferir 50 μ l de la cavidad B1 para la cavidad C1 hasta cavidade H1. Despresar 50 μ l de la última cavidad.
- Pipetar 50 μ l de la suspensión homogéneas de hemáticas en todas las cavidades conteniendo amuestras. Después de la adición da hemáticas tenemos diluciones de 1/80 (A1) hasta 1/10240 (H1).
- Agitar la placa por la vibración mecánica (agitador de placas) o golpeando con los dedos en las bordas de las placas por 3 a 4 minutos.
- Dejar en reposo por 1 hora en temperatura ambiente en local libre de vibraciones (IMPORTANTE).
- Hacer lectura.

Título de la amostra: Mayor dilución que muestra una reacción positiva. El punto final es cuando el tapete de hemáticas cubre 50% del fondo de la cavidad.

DESEMPEÑO DEL TEST

Sensibilidad: Fen 95 muestras, del control de calidad, verdaderamente positivas, fueran testeadas. Todas las muestras fueron identificadas correctamente, sin falso negativo.

Especificidad: 99,7% de especificidad - em 275 muestras, del control de calidad, verdaderamente negativas, fueran testeadas, em estos test el kit presentó un resultado falso positivo.

Precisión

Intra-ensayo: Fueron utilizadas duplicatas de diez pruebas para la evacuación de la precisión dentro del ensayo. Los valores negativos y positivos fueron correctamente identificados en 100% de las veces.

Inter-ensayo: Utilizadas las mismas pruebas, fueran realizadas ensayos independientes con tres diferentes lotes por un periodo de 3 días. Los valores negativos y positivos fueron correctamente identificados en 100% de las veces.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- No utilizar reactivos de lotes diferentes.
- A dejar las placas en reposo, estas no deben sufrir vibraciones, pues perjudicará la cualidad de la lectura.
- El frasco de hemáticas debe ser almacenado en posición vertical correcta para evitar auto-aglutinación irreversible.
- Usar exclusivamente la placa del Kit, que no debe ser reutilizada.
5. Son aceptables variación de 1 o 2 títulos para un mismo suero en las relaciones de hemoaglutinación .
- Ningún teste serológico por hemoaglutinación puede discriminar anticuerpos debido a la infección por *Treponema pallidum* de los anticuerpos debido la infección con otros treponemas patogénicos, como el *T. pertenuae* y o *T. carateum*.
- Recomendase que todos los resultados positivos sean confirmados por el método FTA-Abs, Kit Imuno-con Sífilis (FTA-Abs) de la WAMA.
- El teste puede ser negativo en sífilis activa precoz o en sífilis latente tardía. Para completar el perfil de los resultados para ayudar a los clínicos en el diagnóstico de la sífilis recomendamos el uso de VDRL o RPR. La Wama dispone de lo VDRL y RPR (Reaginas).
- Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueran testados, con resultados negativos para anti-cuerpos anti-HIV, antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y anti-HCV, pero como ninguno método diagnóstico ofrece completa seguridad de la ausencia de este y de otros agentes infecciosos, recomendase tratar los sueros-controles humanos como materiales potencialmente infecciosos.
- No congelar los reactivos
- Como se emplea azida sódica 0,1% como conservante, además de tóxica cuando ingerida, el descarte debe ser acompañado de grandes volúmenes de agua para evitar el acumulo de residuos de azida en las tuberías, pudiendo formar sales altamente explosivos.
- Descarte de lo material de acuerdo con las regulamentaciones locales.
- Seguir las Buenas Prácticas de laboratorio (BPL) en la conservación , manoseo y descarte de los materiales.











TÉRMINOS DE GARANTÍA

La WAMA Diagnostica garantiza el cambio de este conjunto diagnóstico si desde el momento que el mismo esté dentro el plazo de caducidad y sea comprobado por su accesoria técnica de que no hubieron fallos en la ejecución, manoseo y conservación de este producto. La WAMA y sus distribuidores no se responsabilizan por los fallos en el desempeño del kit bajo sobre estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA

- Bhattacharyya, M.N.: Serological tests for syphilis. **Br. Med. J.**, 285: 973, 1982.
- Larsen, S.A.; Hamble, 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.
- Larsen, S.A.; Steiner, B.M.; Rudolph, A.H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 1-21, 1995.
- Luger, A.: Diagnosis of syphilis. **Bull. World Health Organ.**, 59(5): 647-654, 1981.
- Thakar, Y.; Chande, C.; Mahalley, A.D.; Saaji, A.M. Seroprevalence of syphilis by TPHA test. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 39(2) 135-138, 1996.
- Rathlev, T. Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the sero-diagnosis of syphilis. *Br. J. Vener. Dis.* 43(3): 181-185, 1967.

SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA

	O conteúdo é suficiente para (n) testes Quantity sufficient for (n) tests O conteúdo es suficiente para (n) testes		Número do lote Lot Number Número del lote
	Data limite de utilização Expiry Date Fecha de la caducidad		Número do catálogo Catalog Number Número del catálogo
	Produto diagnóstico <i>in vitro</i> In vitro diagnostic Producto diagnóstico <i>in vitro</i>		Limite de temperatura Temperature Limite de temperatura
	Consultar instruções para uso Refer to user's instructions Consultar las instrucciones para el uso		Proteger do calor Keep away from sunlight Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeu		Fabricado por Manufactured by Fabricado por