

**Determinación cualitativa de anticuerpos anti-Treponema pallidum IVD**

Conservar a 2 - 8°C

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

TPHA (*Treponema Pallidum Haemagglutination*) es una prueba de hemoaglutinación indirecta en microplaca para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos específicos anti-*Treponema pallidum* en suero humano o plasma. Los hematíes de ave estabilizados y sensibilizados con una solución antigénica de *T. pallidum*, aglutinan en presencia de anticuerpos anti-*T. pallidum* mostrando unos patrones de aglutinación característicos.

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

La sífilis es una enfermedad venérea provocada por la infección con *T. pallidum*. La transmisión del microorganismo se produce por contacto directo a través de una lesión productiva. El período de incubación es aproximadamente de 20 días y la enfermedad progresa a través de 3 fases distintas con sintomatología diferente. Los anticuerpos anti-*Treponema* aparecen a partir de la primera fase y pueden permanecer en un 85-90% de pacientes tratados a pesar de haber superado la enfermedad.

**REACTIVOS**

<b>R1: Células Test (TC)</b>	Hematíes de ave estabilizados y sensibilizados con antígenos de <i>T. pallidum</i> (Nichols), Conservante., pH, 7,2.
<b>R2: Células Control (CC)</b>	Suspensión estabilizada de hematíes de ave, Conservante., pH, 7,2.
<b>R3: Diluyente (DIL)</b>	Tampón fosfato, extracto de <i>T. pallidum</i> (Reiter), Conservante., pH 7,2
<b>Control +</b>	Suero inmune humano prediluido 1:20. Conservante.
<b>Control -</b>	Suero de animal, Conservante.

**PRECAUCIONES**

Control + / - : H317-Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Contienen 2-Metilisotiazol-3(2H)-ona (Proclin 950).

Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto. Todos los componentes de origen humano han resultado ser negativos para el antígeno HBs, HCV y para el anti-HIV (1/2). Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

Los reactivos contienen azida sódica (<0,1%), que puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre, y formar azidas potencialmente explosivas. Al deshacerse de esta clase de reactivos, verterlos por el desagüe junto con grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida.

**CALIBRACIÓN**

La sensibilidad del reactivo es trazable al 1º Patrón Internacional de Sífilis de OMS.

**CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No congelar: la congelación de los reactivos altera irreversiblemente la funcionalidad de éstos.

Conservar los viales de las Células Test y Control siempre en posición vertical. La conservación en posición horizontal puede ocasionar la aparición de agregados celulares. En caso de cambio de posición agitar hasta la disolución de posibles agregados.

**Indicadores de deterioro de los reactivos:** Presencia de partículas agregadas y turbidez.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Placas de microtitulación con fondo en "U".
- Pipetas de 25-75 µL.

**MUESTRAS**

Suero fresco o plasma. Estable 7 días a 2-8°C. Las muestras se pueden congelar a -20°C o menos, pero se deben descongelar y mezclar bien antes de la prueba. Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas antes del usar. No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

**PROCEDIMIENTO**
**Método cualitativo**

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Preparar una dilución 1:20 de la muestra en Diluyente (10 µL suero + 190 µL Diluyente).
3. Pipetear en pocillos adyacentes de una placa de microtitulación (Nota 1):

Muestra 1/20 o Controles (µL)	25	25
Células Control (µL)	75	--
Células Test (µL)	--	75

4. Agitar suavemente la placa hasta la completa homogenización de las mezclas.
5. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante 45-60 min. (Nota 2).
6. Examinar macroscópicamente los patrones de aglutinación de las células.

**Método semi-cuantitativo**

1. Realizar diluciones dobles a partir de la dilución 1:20 de la muestra en Diluyente.
2. Ensayar cada dilución como se describe en el método cualitativo.

**LECTURA E INTERPRETACIÓN**

Los resultados deben ser leídos comparando los patrones de aglutinación de las Células Test con los de las Células Control (Nota 3). Los resultados se evalúan de acuerdo con los siguientes criterios:

Grado de aglutinación	Lectura	Resultado
Capa de células lisas que recubre por completo el fondo del pocillo, algunas veces con los bordes replegados	4+	Reactivo
Capa de células cubriendo parte del fondo del pocillo	3+	Reactivo
Capa de células rodeada por un círculo rojo	2+	Reactivo
Capa de células cubriendo menos área y rodeadas por un círculo rojo	1+	Reactivo
Botón de células con un pequeño orificio en el centro	±	Límite
Botón compacto y definido de células, a veces con un pequeño orificio en el centro	-	Negativo

El Control Negativo no debe mostrar aglutinación con Células Test ni con Células Control.

El Control Positivo solo debe mostrar aglutinación con las Células Test.

Cualquier aglutinación mostrada con las Células Control, indica la presencia de anticuerpos inespecíficos y no debe interpretarse.

Las muestras con resultado límite deben ser reensayadas e interpretadas como negativas si se produce el mismo patrón de aglutinación.

Las muestras positivas deben ser tituladas según el procedimiento semicuantitativo. Se define el título como la dilución mayor que da resultado reactivo.

El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

**CONTROL DE CALIDAD**

Se recomienda utilizar el control positivo y negativo para controlar la funcionalidad del reactivo, así como modelo de comparación para la interpretación de los resultados.

Todo resultado distinto al resultado que da el control negativo, se considerará positivo.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO**

1. **Sensibilidad analítica:** 0,1 IU/mL frente al 1r Patrón Internacional de plasma sífilítica humana IgG e IgM de NIBSC 05/132.
2. **Sensibilidad diagnóstica:** 100%.
3. **Especificidad diagnóstica:** 100%.

**INTERFERENCIAS**

Bilirrubina (20 mg/L), hemoglobina (10 g/L), lípidos (10 g/L) y factores reumatoídes (300 UI/mL), no interfieren. Otros sustancias pueden interferir\*.

**NOTAS**

1. Mezclar vigorosamente o con el agitador vortex los viales de Células Test y Control inmediatamente antes de usar.
2. Mantener la microplaca alejada de fuentes de vibración, calor y luz solar directa.
3. El patrón de aglutinación de las Células Control no debe tomarse como modelo para la interpretación de resultados negativos, ya éstas producen botones más compactos que con las Células Test.
4. Los sueros con elevado título de anticuerpos pueden mostrar patrones de aglutinación con los bordes muy replegados.

**LIMITACIONES DEL MÉTODO**

- El ensayo de TPHA presenta determinadas inespecificidades con anticuerpos de otras especies de treponemas patógenos. Es recomendable que todos los resultados positivos se confirmen con técnicas alternativas como FTA-Abs.
- Se han descrito reacciones falsamente positivas en muestras de pacientes con mononucleosis, lepra, borreliosis, enfermedades autoinmunes y drogadicción.
- La prueba de TPHA no es útil para controlar la eficacia del tratamiento, ya que el nivel de anticuerpos permanece mucho tiempo después de la curación de la enfermedad.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Larsen S.A. et al., Clin.Microbiol.Rev., 1995.
2. M.Janier et al., European Guideline on the Management of Syphilis, 2014.
3. Ratnam S. et al., Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4<sup>th</sup> ed AACC Press, 1995.

**PRESENTACIÓN**

Ref.: 1200408 100 test

 Células Test (TC) : 1 x 7,5 mL  
 Células Control (CC): 1 x 7,5 mL  
 Diluyente (DIL): 2 x 10 mL  
 Control +: 1 x 1 mL  
 Control -: 1 x 1 mL

Cont.

**Qualitative determination of anti-Treponema pallidum antibodies  
IVD**

Store at 2 - 8°C.

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

The TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination) is an indirect hemagglutination test for the qualitative and semi-quantitative detection of specific anti-*T. pallidum* antibodies in human serum or plasma. Stabilized avian erythrocytes sensitised with an antigenic *T. pallidum* solution, agglutinates in the presence of anti-*T. pallidum* antibodies to give a characteristic patterns.

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Syphilis is a venereal disease caused by *T. pallidum* infection. *T. pallidum* transmission occurs by direct contact with a productive lesion. The incubation period is about 20 days and the disease progress through 3 different stages with different symptomatology. The anti-*T. pallidum* antibodies appears in the first stage and may persist in the 85-90% of treated patients after they have been treated and cured.

**REAGENTS**

<b>R1: Test Cells (TC)</b>	Stabilized avian erythrocytes sensitised with <i>T. pallidum</i> (Nichols) antigens, Preservative, pH 7,2.
<b>R2: Control Cells (CC)</b>	Stabilized suspension of avian erythrocytes, Preservative, pH, 7,2.
<b>R3: Diluent (DIL)</b>	Phosphate buffered saline, pH 7,2, <i>T. pallidum</i> (Reiter) extract, Preservative.
<b>Control +</b>	Immune human serum prediluted 1:20. Preservative
<b>Control -</b>	Animal serum, Preservative

**PRECAUTIONS**

Control + / - : H317-May cause an allergic skin reaction. Contain 2-Methylisothiazol-3(2H)-one (Proclin 950).

Follow the precautionary advice given in the SDS and the product label.

Components from human origin have been tested and found to be negative for the presence of HBsAg, HCV, and antibody to HIV (1/2). However, handle cautiously as potentially infectious.

Reagents contain sodium azide (<0,1%), which can react with lead and copper plumbing, to form potentially explosive azides. When disposing of such reagents, flush with large volumes of water to prevent azide build up.

**CALIBRATION**

The reagent sensitivity is calibrated against the 1<sup>st</sup> International Standard for Syphilitic serum (WHO).

**STORAGE AND STABILITY**

All the kit components will remain stable until the expiration date printed on the label, when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not freeze: frozen reagents could change the functionality of the test.

Store the vials in vertical position. Horizontal position may cause cellular clusters. If the position is changed, gently mix to dissolve aggregates that may be present.

**Reagents deterioration:** Presence of clusters, particles and turbidity.

**ADDITIONAL EQUIPMENT**

- U-well microtitration plates.
- Pipettes 25-75 µL.

**SAMPLES**

Fresh serum or plasma. Stable 7 days at 2-8°C. Samples can be frozen at -20°C or lower, these should be thawed and mixed prior to testing. The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing. Do not use highly hemolized or lipemic samples.

**PROCEDURE**
**Qualitative method**

1. Allow the reagents and sample to reach room temperature.
2. Dilute serum 1:20 with Diluent (10 µL serum + 190 µL Diluent)
3. Pipette into adjacent wells of a microtitration plate (Note 1):

Sample 1:20 or Controls (µL)	25	25
Control Cells (µL)	75	--
Test Cells (µL)	--	75

4. Mix thoroughly the microplate till the complete homogenisation of the mixing reaction.
5. Cover the microplate and incubate at room temperature for 45-60 min. (Note 2).
6. Examine macroscopically the agglutination patterns of the cells.

**Semi-quantitative method**

1. Make two fold dilutions of the prediluted 1:20 sample in Diluent.
2. Test each dilution as described in the qualitative method.

**READING AND INTERPRETATION**

Read the results by comparing the agglutination patterns of the Test Cells with the Control Cells (Note 3). Readings are scored and reported according to the following criteria:

Degree of hemagglutination	Reading	Result
Smooth mat of cells covering entire well bottom, sometimes with folded edges	4+	Reactive
Smooth mat of cells covering part of the well bottom	3+	Reactive
Smooth mat of cells surrounded by a red circle	2+	Reactive
Smooth mat of cells covering less area and surrounded by a smaller red circle	1+	Reactive
Button of cells having a small hole in centre	±	Borderline
Definite compact button of cells, sometimes with a very small hole in the centre.	-	Negative

The Negative Control should not show any agglutination pattern with both Test Cells and Control Cells.

The Positive Control should only show agglutination patterns with Test Cells.

Any agglutination pattern showed by Control Cells indicates the presence of non-specific antibodies and cannot be interpreted. Samples with a borderline pattern should be retested and reported as negatives if the same pattern is reproduced. Reactive samples should be tittered following the semi-quantitative method. The serum titer is defined as the highest dilution showing reactive result.

Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

**QUALITY CONTROL**

Positive and Negative controls are recommended to monitor the performance of procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation.

All result different from the negative control result, will be considered as a positive.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

1. **Analytical sensitivity:** 0,1 IU/mL against the 1st International Standard for human syphilitic plasma IgG and IgM NIBSC 05/132.
2. **Diagnostic sensitivity:** 100%.
3. **Diagnostic specificity:** 100%.

**INTERFERENCES**

Bilirubin (20 mg/dL), hemoglobin (10 g/L), lipids (10 g/L) and rheumatoid factors (300 IU/mL), do not interfere. Other substances may interfere<sup>4</sup>.

**NOTES**

1. Mix vigorously or on a vortex mixer the vials of both Test and Control Cells immediately before use.
2. Keep the microplate away from the vibrations, heat and direct sunlight.
3. The agglutination pattern of the Control Cells should not be used as a reference for negative results since Control Cells give more compact button than do the Test Cells.
4. Sera with a high level of antibodies may give agglutination patterns with very folded edges.

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

- The TPHA test cannot discriminate antibodies anti-*T. pallidum* from antibodies to other pathogenic treponemas. It is recommended that all positive results be confirmed by alternative procedures as FTA-Abs.
- False positive results have been described with samples of patients with mononucleosis, leprosy, borreliosis, autoimmune diseases and drug addiction.
- The TPHA test is not useful in determining the effectiveness of the therapy, since the antibodies level remains long time after the disease has been clinically cured and the test remains positive.

**BIBLIOGRAPHY**

1. Larsen S.A. et al., Clin.Microbiol.Rev., 1995.
2. M.Janier et al., European Guideline on the Management of Syphilis, 2014.
3. Ratnam S. et al., Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4<sup>th</sup> ed AACC Press, 1995.

**PACKAGING**

Ref.: 1200408 100 test

Cont.

Test Cells (TC): 1 x 7.5 mL  
Control Cells (CC): 1 x 7.5 mL  
Diluent (DIL): 2 x 10 mL  
Control + : 1 x 1 mL  
Control - : 1 x 1 mL

**Détermination qualitative des anticorps anti-*Treponema pallidum* IVD**

Conserver à +2-8°C

**PRINCIPE DE LA TECHNIQUE**

TPHA (*Treponema Pallidum Hémagglutination*) est un test d'hémagglutination indirecte sur microplaque pour la détection qualitative et semi-quantitative des anticorps spécifiques anti-*Treponema pallidum* dans le sérum humain ou plasma. Les hématies aviaires stabilisées et sensibilisées avec une solution antigénique de *T. pallidum* s'agglutinent en présence d'anticorps anti-*T. pallidum* pour donner une agglutination caractéristique.

**SIGNES CLINIQUES**

La syphilis est une maladie vénérienne causée par une infection à *T. pallidum*. La transmission de *T. pallidum* se fait par contact direct avec une lésion productive. La période d'incubation est approximativement de 20 jours et la maladie progresse selon 3 phases distinctes avec des symptômes différents. Les anticorps anti-*T. pallidum* apparaissent lors de la première phase et peuvent encore persister chez 85-90% des patients après traitement.

**REACTIFS**

<b>R1: Cellules Test</b>	Hématies aviaires stabilisées et sensibilisées avec des antigènes <i>T. pallidum</i> (Nichols), pH 7,2, Preservative.
<b>R2: Cellules Contrôle</b>	Suspension d'hématies aviaires stabilisées, pH 7,2, Preservative
<b>R3: Diluant</b>	Tampon phosphate, extrait <i>T.pallidum</i> (Reiter), pH 7,2, Preservative,
<b>Contrôle +</b>	Sérum humain immunisé pré-dilué au 1:20. Preservative
<b>Contrôle -</b>	Sérum animal, Preservative

**PRECAUTIONS**

Contrôle + / - : H317-Peut provoquer une allergie cutanée. Contient du 2-méthylisothiazol-3(2H)-one (ProClin 950).

Suivre les conseils de prudence indiqués dans la FDS et l'étiquette du produit. Les composants d'origine humaine ont tous été testés et ont donné un résultat négatif pour les antigènes HBs, HCV et les anticorps anti-HIV (1/2). Cependant les réactifs doivent être manipulés avec précaution comme potentiellement infectieux. Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (<0,1%), qui peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre, pour former des azotures potentiellement explosifs. Lors de la mise au rebut de ces réactifs, rincez à grande eau pour éviter l'accumulation d'azide.

**ETALONNAGE**

La sensibilité du réactif est calibrée selon le 1<sup>er</sup> Etalon International pour Sérum Syphilitique (OMS).

**CONSERVATION ET STABILITE**

Tous les composants du kit restent stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du coffret, lorsqu'ils sont conservés bien fermés à +2-8°C et que les contaminations sont évitées lors de leur utilisation. Ne pas congeler : la congélation des réactifs altère irréversiblement les performances du test. Toujours maintenir les flacons en position verticale. Si la position est changée mélanger délicatement pour dissoudre les agrégats qui peuvent être présents. **Indication de détérioration des réactifs** : présence d'agrégats et turbidité.

**MATERIEL ADDITIONNEL**

- Microplaque avec fond en U
- Pipettes de 25-75 µL

**ECHANTILLONS**

Sérum frais ou plasma. Stable 7 jours à 2-8°C. Les échantillons peuvent être congelés à -20°C ou moins, ils doivent être décongelés et mélangés avant le test. Les échantillons présentant des traces de fibrine doivent être centrifugés. Ne pas utiliser d'échantillons hautement hémolysés ou lipémiques.

**PROCEDURE**
**Méthode qualitative**

- Attendre que les réactifs et les échantillons atteignent la température ambiante.
- Diluer le sérum au 1:20 avec le Diluant R3 (5 µL sérum + 95 µL Diluant).
- Pipeter dans 2 puits adjacents distincts de la microplaque (Note 1) :

Sérum au 1:20 ou contrôles +/- (µL)	25	25
Cellules Contrôles (µL)	75	--
Cellules Test (µL)	--	75

- Agiter doucement la microplaque jusqu'à l'homogénéisation complète du mélange réactionnel.
- Couvrir la microplaque et incuber à température ambiante pendant 45-60 minutes (Remarque 2).
- Réaliser un examen macroscopique du profil d'agglutination des cellules.

**Méthode semi-quantitative**

- Réaliser une dilution 2X en série de l'échantillon pré-dilué au 1:20 dans le Diluant (R3).
- Procéder pour chaque dilution de la même façon que dans la méthode qualitative.

**LECTURE ET INTERPRETATION**

Lire les résultats en comparant les profils d'agglutination des cellules Test et des cellules Contrôle (Note 3). Les résultats s'évaluent selon les critères suivants :

Degré d'hémagglutination	Lecture	Résultat
Voile uniforme de cellules recouvrant tout le fond du puits, parfois avec les bords repliés	4+	Positif
Voile de cellules recouvrant partiellement le fond du puits	3+	Positif
Voile de cellules entouré par un anneau rouge	2+	Positif
Voile de cellules moins étendu et entouré par un anneau rouge	1+	Positif
Bouton de cellules avec un petit orifice au centre	±	Limite
Bouton compact et bien défini, parfois avec un très petit orifice au centre	-	Négatif

Le contrôle négatif ne doit montrer aucune agglutination ni avec les cellules Test, ni avec les cellules Contrôle. Le contrôle positif doit seulement montrer une agglutination avec les cellules Test. Certains profils d'agglutination obtenus avec les cellules Contrôle indiquent la présence d'anticorps non spécifiques et ne doivent pas être interprétés. Les sérums présentant des résultats limites doivent être retestés et rendus négatifs si le même profil d'agglutination est obtenu. Les échantillons positifs doivent être titrés selon la méthode semi-quantitative. Le titre du sérum correspond à la dilution la plus élevée présentant un résultat positif. Un diagnostic clinique ne doit pas être uniquement basé sur les résultats d'un simple test, mais doit intégrer en même temps les différentes données cliniques du patient.

**CONTROLE DE QUALITE**

L'utilisation des contrôles positif et négatif est recommandée pour contrôler les performances du réactif latex, et apporte également un point de comparaison pour un meilleur rendu des résultats. Tout résultat autre que le résultat qui donne le contrôle négatif est considéré comme positif.

**PERFORMANCES**

- Sensibilité analytique**: 0,1 UI/mL contre la 1<sup>ère</sup> norme internationale pour syphilitique IgG de plasma humain et IgM NIBSC 05/132.
- Sensibilité diagnostique**: 100%.
- Spécificité diagnostique**: 100%.

**INTERFERENCES**

Aucune interférence avec : hémoglobine (10 g/L), bilirubine (20 mg/dL), lipides (10 g/L) et facteurs rhumatoïdes (300 UI/mL). D'autres substances peuvent provoquer des interférences.

**NOTES**

- Mélanger vigoureusement ou avec l'agitateur vortex les flacons des cellules Test et Contrôle immédiatement avant utilisation.
- Conserver la microplaque à l'abri des vibrations, de la chaleur et de la lumière directe du soleil.
- Le profil d'agglutination des cellules Contrôle ne doit pas être utilisé comme référence pour un résultat négatif, puisque certaines cellules Contrôle produisent des boutons plus compacts que ceux des cellules Test.
- Les sérums présentant un taux élevé d'anticorps peuvent produire des profils d'agglutination avec les bords très repliés.

**LIMITES DE LA PROCEDURE**

- Le test TPHA ne permet pas la discrimination entre les anticorps anti-*T. pallidum* et les anticorps des autres espèces tréponémiques pathogènes. Il est recommandé de confirmer tous les résultats positifs avec des techniques alternatives comme FTA-Abs.
- Des résultats faux positifs ont été décrits sur des échantillons de patients avec la mononucléose, la lèpre, la borréliose, certaines maladies auto-immunes ou une dépendance à la drogue.
- Le test TPHA n'est pas utile pour le suivi de l'efficacité du traitement, puisque le taux d'anticorps se maintient longtemps après que le traitement de la maladie.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Larsen S.A. et al., Clin.Microbiol.Rev., 1995.
- M.Janier et al., European Guideline on the Management of Syphilis, 2014.
- Ratnam S. et al., Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4<sup>th</sup> ed AACC Press, 1995.

**CONDITIONNEMENT**

Réf.: 1200408 100 tests

Cont.

Cellules test (TC) : 1 x 7,5 mL  
 Cellules Contrôle (CC) : 1 x 7,5 mL  
 Diluant (DIL) : 2 x 10 mL  
 Contrôle + : 1 x 1 mL  
 Contrôle - : 1 x 1 mL

**Determinação qualitativa de anticorpos anti-Treponema pallidum IVD**

Conservar a 2 - 8°C

**PRINCÍPIO DO MÉTODO**

TPHA (*Treponema Pallidum Haemagglutination*) é uma prova de hemoaglutinação indirecta em microplaca para a detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos específicos anti-*Treponema pallidum* no soro humano ou plasma. As hemácias de ave estabilizadas e sensibilizadas com uma solução antigénica de *T. pallidum*, aglutinam na presença de anticorpos anti-*T. pallidum* mostrando uns padrões de aglutinação característicos.

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

A sífilis é uma doença venérea provocada pela infecção com *T. pallidum*. A transmissão do microorganismo faz-se por contacto directo através de uma lesão activa. O período de incubação é de aproximadamente 20 dias e a doença evolui por 3 fases distintas com sintomatologia diferente. Os anticorpos anti-*Treponema* aparecem a partir da primeira fase e podem permanecer em 85-90% de doentes tratados mesmo depois de estarem curados.

**REAGENTES**

<b>R1: Células Teste (TC)</b>	Hemácias de ave estabilizadas e sensibilizadas com antígenos de <i>T.pallidum</i> (Nichols), Conservante, pH, 7,2.
<b>R2: Células Controlo (CC)</b>	Suspensão estabilizada de hemácias de ave, Conservante, pH, 7,2.
<b>R3: Diluente (DIL)</b>	Tampão fosfato, extracto de <i>T.pallidum</i> (Reiter), Conservante, pH 7,2
<b>Control +</b>	Soro immune humano prediluído 1:20. Conservante
<b>Control -</b>	Soro de animal, Conservante

**PRECAUÇÕES**

Controle + / - : H317-Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Contém 2-metilisotiazol-3(2H)-ona (Proclin 950).

Siga os conselhos de precaução fornecidos na SDS e no rótulo do produto.

Todos os componentes de origem humana apresentaram resultados negativos para o antígeno HBs, HCV e para o anti-HIV (1/2). No entanto, devem considerar-se, como precaução, como potencialmente infecciosos.

Os reagentes contêm azida de sódio (<0,1%), que pode reagir com o encanamento de chumbo e cobre, formando azidas potencialmente explosivas. Ao descartar esses reagentes, lave com grandes volumes de água para evitar o acúmulo de azida.

**CALIBRAÇÃO**

A sensibilidade do reagente está standartizada com o 1º Padrão Internacional de Sífilis de OMS.

**CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE**

Todos os reagentes do kit estão prontos para serem utilizados e são estáveis até ao prazo de validade indicado na etiqueta do frasco, desde que se mantenham os frascos bem fechados a 2-8°C, e se evite a sua contaminação durante a utilização. Não congelar: a congelação dos reagentes altera irreversivelmente a sua funcionalidade.

Conservar os frascos com as células teste e controlo sempre em posição vertical. A conservação em posição horizontal pode levar ao aparecimento de agregados celulares. Em caso de alteração de posição, agitar até à dissolução de possíveis agregados.

**Indicadores de deterioração dos reagentes:** Presença de partículas e turvação.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Placas de microtitulação com fundo em "U".
- Pipetas de 25-75 µL.

**AMOSTRAS**

Soro fresco ou plasma. Estável 7 dias a 2-8°C. Les échantillons peuvent être congelés à -20°C ou moins, ils doivent être décongelés et mélangés avant le test. As amostras com restos de fibrina devem ser centrifugadas antes da sua utilização. Não utilizar amostras altamente hemolizadas ou lipémicas.

**PROCEDIMENTO**
**Método Qualitativo**

- Os reagentes e amostras deverão estar a temperatura ambiente.
- Preparar uma diluição 1:20 da amostra com Diluente (10 µL soro + 190 µL Diluente).
- Pipetar em áreas adjacentes de uma placa de microtitulação (Nota 1):

Amostra 1/20 ou Controlos (µL)	25	25
Células Controlo (µL)	75	--
Células Teste (µL)	--	75

- Agitar suavemente a placa até completa homogeneização das misturas.
- Cobrir a placa e incubar a temperatura ambiente durante 45-60 min. (Nota 2).
- Examinar macroscopicamente os padrões de aglutinação das células.

**Método semi-quantitativo**

- Realizar diluições duplas a partir da diluição 1:20 da amostra com Diluente.
- Ensaia cada diluição como descrito no método qualitativo.

**LEITURA E INTERPRETAÇÃO**

Os resultados devem ser lidos comparando os padrões de aglutinação das Células Teste com os das Células Controlo (Nota 3). Os resultados avaliam-se de acordo com os seguintes critérios:

Grau de Aglutinação	Leitura	Resultado
Camada de células lisas que cobrem por completo o fundo da placa, por vezes com os bordos pregueados	4+	Reactivo
Camada de células cobrindo parte do fundo da placa	3+	Reactivo
Camada de células rodeada por um círculo vermelho	2+	Reactivo
Camada de células cubrindo menos área e rodeadas por um círculo vermelho	1+	Reactivo
Monte de células com um pequeno orifício no centro	±	Límite
Monte compacto e definido de células, por vezes com um pequeno orifício no centro	-	Negativo

O Controlo Negativo não deve apresentar aglutinação com as Células Teste nem com as Células Controlo.

O Control Positivo só deve apresentar aglutinação com as Células Teste.

Qualquer aglutinação que apareça com as Células Controlo, indica a presença de anticorpos inespecíficos e não se deve interpretar.

As amostras com resultado limite devem ser repetidas e interpretadas como negativas se apresentarem o mesmo tipo de padrão de aglutinação.

As amostras positivas devem ser tituladas segundo o procedimento semi-quantitativo. Define-se o título como a diluição máxima que dá resultado positivo. O diagnóstico clínico não deve realizar-se unicamente com os resultados de um único ensaio, devendo considerar-se ao mesmo tempo os dados clínicos do doente.

**CONTROLO DE QUALIDADE**

Recomenda-se a utilização do controlo positivo e negativo para controlar a funcionalidade do reagente, e também como modelo de comparação para a interpretação dos resultados.

Qualquer resultado distinto do controlo negativo será considerado como positivo.

**CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO**

- Sensibilidade analítica:** 0,1 UI/mL contra o primeiro padrão internacional para IgG plasma humano sífilítica e IgM NIBSC 05/132.
- Sensibilidade diagnóstica:** 100%.
- Especificidade diagnóstica:** 100%.

**INTERFERÊNCIAS**

Bilirubina (20 mg/L), hemoglobina (10 g/L), lípidos (10 g/L) e factores reumatóides (300 UI/mL), não interferem. Outras substâncias podem interferir<sup>4</sup>.

**NOTAS**

- Misturar vigorosamente ou com o agitador vortex os frascos de Células Teste e Controlo imediatamente antes de usar.
- Manter a microplaca longe de fontes de vibração, calor e luz solar directa.
- O padrão de aglutinação das Células Controlo não deve ser considerado como modelo para a interpretação de resultados negativos pois estes produzem aglomerados mais compactos do que com as Células.
- Os soros com título elevado de anticorpos podem apresentar padrões de aglutinação com os bordos muito pregueados.

**LIMITAÇÕES DO MÉTODO**

- O ensaio de TPHA apresenta determinadas inespecificidades com anticorpos de outras espécies de treponemas patogénicos. Recomenda-se que todos os resultados positivos sejam confirmados com técnicas alternativas como FTA Abs.

- Encontram-se descritas reacções falsamente positivas em amostras de pacientes com mononucleose, lepra, boreliose, doenças autoimunes e dependentes de drogas

- A prova de TPHA não é útil para controlar a eficácia do tratamento, uma vez que o nível de anticorpos se mantém por muito tempo depois da cura da doença.

**BIBLIOGRAFIA**

- Larsen S.A. et al., Clin.Microbiol.Rev., 1995.
- M.Janier et al., European Guideline on the Management of Syphilis, 2014.
- Ratnam S. et al., Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4<sup>th</sup> ed AACC Press, 1995.

**APRESENTAÇÃO**

Ref.: 1200408 100 test

Cont.

 Células Test (TC) : 1 x 7,5 mL  
 Células Control (CC): 1 x 7,5 mL  
 Diluyente (DIL): 2 x 10 mL  
 Control +: 1 x 1 mL  
 Control -: 1 x 1 mL