



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road, Bootle
Liverpool, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mastgrp.com
Web: www.mastgrp.com

Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mastgrp.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mastgrp.com



**Mast
Group**

MAST-TPHA

Uso pretendido

HA101. Um ensaio de hemaglutinação para *Treponema pallidum* líquido estável para o serodiagnóstico de sífilis.

APENAS PARA USO NO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Conteúdo

O MAST-TPHA contém os seguintes componentes para HA101-200 testes (HA102-2000 testes):

1. Diluente de Amostra, pronto a usar. 2x 20ml. Contém tampão fosfato pH 7.2 e soro de Coelho 'normal'.
2. Células Teste, prontas a usar. 2x 8.5ml cada com uma suspensão de eritrócitos de galinha castanhos, sensibilizados com antígeno de *T. pallidum* (estirpe de Nichol) numa base com tampão fosfato com componentes celulares de *T. pallidum* (estirpe de Reiter).
3. Células Controlo, prontas a usar. 2x 8.5ml cada com uma suspensão de eritrócitos de galinha castanhos não sensibilizados numa base com tampão fosfato com componentes celulares de *T. pallidum* (estirpe de Reiter).
4. Controlo Positivo, pronto a usar. 1x 2ml de soro humano diluído com anticorpos específicos para *T. pallidum*. Fornece prediluído 1:20 e como um título de 1:2560 ± uma diluição ao dobro.
5. Controlo Negativo, pronto a usar. 1x 2ml de soro humano diluído negativo para *T. pallidum*.
6. Folheto de Instruções.

Os itens 1-5 acima contém todos azida de sódio a 0.095% como conservante.

Estabilidade e armazenamento

Armazenar fechado a 2 a 8°C até à data de validade indicada no rótulo da embalagem. Depois de aberto, o MAST-TPHA deve ser armazenado a 2 a 8°C e pode ser utilizado até à data de validade indicada no rótulo. **Não congelar os reagentes.**

As amostras podem ser armazenadas a 2 a 8°C até 48 horas antes de serem testadas. Se for necessário armazenamento mais prolongado, armazenar a menos 20°C até 1 ano. As amostras descongeladas devem ser agitadas antes de serem testadas.

Avisos e precauções

Os reagentes MAST-TPHA contém material de origem humana e foram testados e confirmados negativos para anticorpos HCV, HIV I e HIV II, e HBsAg por procedimentos aprovados ao nível de dador único. Como nenhum teste pode oferecer garantia completa de que os produtos derivados de origem humana não vão transmitir agentes infecciosos é recomendado que os reagentes deste kit sejam manuseados com o devido cuidado e atenção durante a utilização e eliminação. Não ingerir. Os reagentes MAST-TPHA não contém substâncias perigosas conforme definido pelos Regulamentos Químicos actuais do UK (Informação de Riscos e Embalagem para Fornecimento). Todos os reagentes devem, no entanto, ser tratados como potenciais riscos biológicos na utilização e eliminação. Seguir as precauções de risco biológico e as técnicas assépticas aprovadas. Deve ser utilizado apenas por pessoal laboratorial adequadamente formado e qualificado. Esterilizar todos os resíduos de risco biológico antes da sua eliminação. O conservante azida de sódio pode ser tóxico se ingerido e pode reagir com canalizações de chumbo e de cobre formando sais altamente explosivos. Eliminar sempre despejando juntamente com muita água. Ter como referência a folha de Dados de Segurança do Produto. Os testes de hemaglutinação são sensíveis aos efeitos do calor, da luz solar directa e vibração. Manter afastado dessas fontes durante os períodos de incubação do teste. Não permitir a contaminação das amostras ou dos reagentes com saliva pois isso irá causar resultados erróneos.

Utilizar uma nova ponta descartável para cada amostra para prevenir contaminação cruzada. Colocar as tampas em todos os reagentes imediatamente após a utilização.

Não deixar que o reagente esorra pelas paredes do poço. Antes de iniciar o ensaio deixar todos os reagentes atingir a temperatura ambiente (20°C a 25°C). Misturar suavemente todos os reagentes por inversão suave ou rotação.

Não utilizar componentes do kit danificados ou contaminados.

Os componentes do kit estão agrupados e não devem ser trocados entre lotes.

Materiais necessários mas não fornecidos

Microdiluidores ou micropipetas capazes de dispensar 25, 75 e 100µl. Rigid U well microtitre plates e.g. Dynatech M24A.

Colheita e preparação do espécime

O teste está concebido para ser utilizado apenas com amostras de soro e LCR. Não deve ser utilizado plasma. Obter uma amostra de sangue venoso do doente e deixar que o coágulo se forme e retraia. Centrifugar a amostra de sangue coagulado e separar o soro límpido. Não utilizar no teste soro hemolisado, contaminado ou lipémico.

As amostras de soro devem ser completamente ressuspendidas antes de utilizadas. As amostras não necessitam de qualquer pré-tratamento. Não congelar e descongelar repetidamente os espécimes, pois isto pode causar falsos resultados.

Procedimento

A. Preparação do reagente

1. Deixar que os reagentes MAST-TPHA atinjam a temperatura ambiente antes da sua utilização.
2. Ressuspender completamente as Células Teste e Controlo antes de utilizar. Não induzir a formação de espuma.

B. Procedimento qualitativo (rastreo)

Cada teste necessita de 4 poços de uma microplaca.

1. Dispensar o Diluente de Amostra na microplaca como se segue:
 - 25µl nas linhas 1, 3 & 4 e 100µl na linha 2.
2. Dispensar 25µl de cada amostra num poço na linha 1.
 - Misturar bem e transferir 25µl da linha 1 para a linha 2.
 - Misturar bem e transferir 25µl da linha 2 para a linha 3.
 - Misturar bem e rejeitar 25µl da linha 3.
 - Transferir 25µl da linha 2 para a linha 4.
 - Misturar bem e rejeitar 25µl da linha 4.
3. Adicionar 75µl de Células Controlo bem homogeneizadas à linha 3.
4. Adicionar 75µl de Células Teste bem homogeneizadas à linha 4.

5. Bater suavemente com a placa para misturar. A diluição final da amostra nas linhas 3 e 4 é 1/80.
6. Cobrir e deixar em repouso à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos (alternativamente as placas podem ser deixadas durante a noite).
7. Pesquisar padrões de aglutinação.

Nota: Os controlos do kit estão pré-diluídos e devem ser adicionados directamente nos poços individuais das linhas 3 e 4 (não é necessário diluente).

C. Procedimento de rastreio alternativo com diluição num poço.

1. Dispensar 190µl de diluente na linha 1.
2. Dispensar 10µl de amostra na linha 1 e misturar.
3. Rjeitar 150µl da linha 1.
4. Adicionar 25µl da linha 1 à linha 2.
5. Adicionar 75µl de Células Teste bem homogeneizadas à linha 1.
6. Adicionar 75µl de Células Controlo bem homogeneizadas à linha 2.
7. Bater suavemente com a placa para misturar.
8. A diluição final da amostra nas linhas 1 e 2 é 1/80.
9. Cobrir e deixar em repouso à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos (alternativamente as placas podem ser deixadas durante a noite).
10. Pesquisar padrões de aglutinação.

D. Procedimento quantitativo

Se se pretender quantificar por rotina os resultados positivos pode-se modificar o procedimento de rastreio omitindo as células de controlo e preparando apenas uma diluição final. A maioria das amostras serão negativas ou genuinamente positivas, e as Células Controlo podem ser utilizadas no procedimento quantitativo abaixo.

1. Preparar diluições numa placa de microtitulação como se segue:
 - Para cada amostra, dispensar 25µl de diluente em cada poço de uma coluna da placa. Para titulações de controlos a dispensação deve começar a partir da linha 3.
 - Transferir 25µl da linha 2 da placa de rastreio original para a linha 1 da placa quantitativa.
 - Misturar e rejeitar 25µl.
 - Transferir 25µl da linha 2 da placa de rastreio original para a linha 2 da placa quantitativa.
 - Preparar diluições ao dobro com 25µl desde a linha 2 até à linha 8 (para os controlos as diluições ao dobro devem começar a partir da linha 3).
2. Adicionar 75µl das Células Controlo bem homogeneizadas à linha 1.
3. Adicionar 75µl de Células Teste bem homogeneizadas às linhas 2 a 8.
4. Bater suavemente com a placa para misturar.

A diluição final da amostra nas linhas 1 e 2 é 1/80.

5. Cobrir e deixar em repouso à temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos (ou durante a noite).

Nota: Os controlos do kit estão pré-diluídos e devem ser adicionados directamente 25µl nos poços individuais das linhas 1, 2 e 3 com as diluições ao dobro a começar na linha 3 (não é necessário diluente nas linhas 1 e 2).

Interpretação de resultados

Procedimento de Rastreio

As células aglutinadas formam uma camada suave, homogénea sobre o fundo do poço. As células não aglutinadas formam um botão compacto no centro do poço. As células com aglutinação fraca formam um padrão em anel característico ou um tapete de células rodeado por um círculo vermelho. A aglutinação das Células Teste mas não das Células Controlo indica a presença de anticorpo específico para *T. pallidum*. Ausência de aglutinação com as Células Teste indica que o anticorpo específico para *T. pallidum* está ausente ou abaixo do limite de detecção. O padrão das Células Controlo não deve ser utilizado como uma indicação de um padrão negativo com Células Teste pois formam um botão de células mais compacto. A aglutinação das Células Controlo bem como das Células Teste indica a presença de anticorpo anti-célula. Neste caso o teste não é válido e deve ser repetido. Se o teste não for válido deve ser repetido depois de se ter efectuado uma absorção do soro teste. Para conseguir isto, diluir o soro teste a 1/4 com Células Controlo e deixar em repouso à temperatura ambiente durante 45-60 minutos. Depois de centrifugar a amostra (1000rpm/5min.) diluir o sobrenadante 1/5 em diluente. Testar esta diluição directamente, sem mais diluição, utilizando as suspensões de Células Teste e Controlo. Também é recomendado um teste FTA ABS confirmatório.

Procedimento Quantitativo

Interpretar os resultados como para o procedimento de rastreio. O título é a mais alta diluição com aglutinação. O soro de Controlo Positivo deve dar um título de 1/2560 ± uma diluição ao dobro. A diluição inicial para o procedimento quantitativo é de 1/80. Foram detectados títulos de 1/164,000 sem efeito prozona (Hook).

Limitações de utilização

O teste apenas foi validado para ser utilizado com amostras de soro ou de LCR. Não reutilizar este produto. Nenhum teste serológico de aglutinação pode discriminar entre anticorpo devido a infecção com *T. pallidum* e anticorpo devido a infecção com outros treponemas patogénicos i.e. *T. pertenue* e *T. carateum*. Não foram identificados outros factores interferentes no entanto todas as amostras positivas devem ser confirmadas por exemplo com procedimento FTA-ABS, juntamente com outros achados clínicos.

Um resultado positivo baixo ou suspeito deve ser repetido. O diagnóstico não deve ser efectuado apenas com base nos resultados de um ensaio clínico. Ao fazer uma interpretação do teste é fortemente recomendado ter em consideração todos os dados clínicos. O teste pode dar um resultado negativo em casos de Sífilis activa recente ou de Sífilis latente antiga. Para completar o perfil de resultados, é recomendada a realização de um teste RPR ou VDRL/antigénio com carvão com a amostra do doente, pois estes testes irão detectar Sífilis activa.

Controlo da Qualidade

Os controlos do kit ou amostras reactivas de valor conhecido devem ser testados em cada corrida do teste. O controlo negativo do kit deve dar um resultado negativo após 45 minutos. O controlo positivo do kit deve dar um resultado positivo após 45 minutos. Se os níveis dos controlos ou das amostras conhecidas não dão os resultados esperados, os resultados dos testes devem ser considerados inválidos.

Referências

Bibliografia disponível mediante pedido.