

Imuno-CON FTA-Abs Sífilis

Kit para determinação de anticorpos anti-*Treponema pallidum* no soro humano por imunofluorescência indireta.

Kit para determinação de anticorpos anti-Treponema pallidum no soro humano por imunofluorescência indireta.

An indirect immunofluorescence kit for the detection of anti-Treponema pallidum antibody in human serum.

Kit para la determinación de anticuerpos anti-Treponema pallidum en el suero humano por inmunofluorescencia indirecta.

Kit para la determinación de anticuerpos anti-Treponema pallidum en el suero humano por inmunofluorescencia indirecta.

[REF]	15060-I: 60 determinações / determinations / determinaciones
[REF]	15100-I: 100 determinações / determinations / determinaciones

[WAMA]	WAMA Diagnóstica
[WAMA]	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
[ECR EP]	Obelis S.A. Boulevard Général Wahis 53 1030 Brussels, BELGIUM Phone. +(32) 2 732-59 54 Fax : +(32) 2 732-60 03 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 utero*, 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 **FTA-Abs** é um dos mais sensíveis e específicos testes empregados na sorologia da sífilis. Entretanto, podem ocorrer reações falso-positivas em cirrose, herpes genital, lupus eritematoso sistêmico e, muito raramente, em mulheres grávidas.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os anticorpos *anti-Treponema pallidum* presentes no soro ligam-se ao antígeno fixado na lâmina e são revelados por uma antigamaglobulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína.

APRESENTAÇÃO DO KIT

[**REF****]** **15060-I (60 determinações)**

1. Lâminas com 5 áreas reativas com suspensão de *Treponema pallidum* (12 lâminas)

2. Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (1x3ml)
3. Tampão fosfato-salino (PBS) (2 x 50ml)
4. Glicerina tamponada (1x4ml)
5. Solução absorvente (Treponema cepa Reiter) (1x3ml)
6. Soro controle positivo (1x1ml)
7. Soro controle negativo (1x1ml)
8. Lâminulas (12 unidades)
9. Instruções para uso

[**REF****]** **15100-I (100 determinações)**

1. Lâminas com 5 áreas reativas com suspensão de *Treponema pallidum* (20 lâminas)
2. Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (1x5ml)
3. Tampão fosfato-salino (PBS) (3 x 50ml)
4. Glicerina tamponada (1x4ml)
5. Solução absorvente (Treponema cepa Reiter) (1x5ml)
6. Soro controle positivo (1x1ml)
7. Soro controle negativo (1x1ml)
8. Lâminulas (20 unidades)
9. Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

• **LÂMINAS COM SUSPENSÃO DE TREPONEMA (1):** deixá-las em temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-las do envelope. Estáveis em geladeira (2- 8°C) até a data do vencimento.

• **ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (IgG) MARCADA (2):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C) até a data de vencimento. Proteger da luz. Contém azida sódica 0,095%.

• **TAMPÃO FOSFATO-SALINO (PBS) (3):** diluir o PBS (0,01M; pH7,2 ± 0,2) concentrado 1/20 (Ex.: 10ml de PBS + 190ml de água destilada ou deionizada). Conservar em geladeira em recipiente limpo e bem vedado. Desprezar a solução se ocorrer mudança do pH ou turvação. Estável até a data do vencimento. Obs.: Caso ocorra cristalização do PBS antes da sua diluição, colocar em banho-maria 37°C até a completa dissolução dos cristais.

• **GLICERINA TAMPONADA (4):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C) até a data do vencimento.

• **SOLUÇÃO ABSORVENTE (5):** para remoção de anticorpos anti-treponema inespecíficos. Pronta para uso. Agitar antes de usar. Os soros desconhecidos deverão ser diluídos em solução absorvente na proporção 1/5 (sugere-se 10µl do soro + 40µl da solução absorvente). Estável até a data de vencimento.

• **SORO CONTROLE POSITIVO (6):** pronto para uso. Estável até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,095%.

• **SORO CONTROLE NEGATIVO (7):** pronto para uso. Estável até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,095%.

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

AMOSTRAS

Soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Os soros podem ser conservados em geladeira (2-8°C) até 72 horas. Para um tempo maior, devem ser guardados em freezer, a -20°C. Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Microscópio de fluorescência
- Tubos de ensaio
- Pipetas sorológicas
- Jarra de Coplin ou similar
- Água destilada ou deionizada
- Frasco para 1 litro
- Câmara de incubação
- Papel absorvente

PROCEDIMENTO

- Recomenda-se inativar o soro por 30 minutos, a 56°C (Não obrigatório).
- Diluir os soros desconhecidos 1/5 como a solução absorvente (ver PREPARAÇÃO DOS REAGENTES). Deixar 15 minutos em temperatura ambiente.
- Deixar a(s) lâmina(s) atingir(em) a temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s) sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.
- Pingar 1 gota dos controles positivo e negativo nas áreas 1 e 2 da(s) lâmina(s), respectivamente e do(s) soro(s) desconhecido(s), nas áreas restantes, evitando transbordar as áreas.
- Incubar na câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente.
- Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com aproximadamente 10ml de tampão fosfato-salino (PBS) (3). Usando uma pipeta dirigir o PBS pela borda longitudinal da lâmina, tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem.
- Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS, sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir IMEDIATAMENTE para a etapa 8 para não secar o local da reação.
- Retornar à câmara úmida. Pingar 1 gota da antigamaglobulina marcada em cada área da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de recobri-la(s) totalmente.

9. Incubar em câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente, protegendo do excesso de luz.

10. Repetir a etapa 6.

11. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS, sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir IMEDIATAMENTE para a etapa 12 para não secar o local da reação.

12. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada (4) entre as áreas reativas. Cobrir a(s) lâmina(s) com laminula(s), evitando a formação de bolhas. Secar o excesso de glicerina com papel absorvente. Limpar o dorso da lâmina.

13 Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer a leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-la(s) na geladeira (2-8°C), protegida(s) da luz e lê-las no dia seguinte. A glicerina não deve secar. Se isto ocorrer colocar mais glicerina.

RESULTADO DAS LEITURAS

Reação Negativa: AUSÊNCIA de fluorescência amarelo-esverdeada no espiroqueta (*T. pallidum*). Geralmente não se observa o espiroqueta ou vê-se muito tenuamente.

Reação Positiva: PRESENÇA de fluorescência amarelo-esverdeada característica no espiroqueta (*T. pallidum*).

OBSERVAÇÃO: Examinar sempre os controles positivo e negativo para controle da reação.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Soros com reação negativa são informados como **NÃO REAGENTES** e significam indivíduos não infectados com títulos inferiores a 1/5. Soros com reação positiva são informados como **REAGENTES** e significam indivíduos infectados pelo *Treponema pallidum* ou infecção pregressa com títulos iguais ou superiores a 1/5. Na maioria dos casos, mesmo após a cura da doença, o **FTA-Abs** persiste reagente por vários anos.

Obs.: Não se recomenda titular amostras positivas através deste método, pois títulos altos podem persistir por vários anos, isto não significa que o paciente encontra-se em qualquer fase de infecção ou seja outros métodos como VDRL ou RPR que são testes não treponêmicos podem indicar melhores situações de tratamento aliado a clínica deste paciente, caso se faça necessário a titulação utilize métodos como hemaglutinação indireta (TPHA).

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

O uso deste método evita possíveis respostas não específicas, no entanto, os resultados devem ser usados em conjunto com informações disponíveis quanto da avaliação clínica e outros procedimentos diagnósticos.

A fonte de luz, filtros e a óptica das diferentes marcas de microscópios de fluorescência influenciarão a sensibilidade do teste.

DESEMPENHO DO TESTE

Sensibilidade Clínica ou Diagnóstica: 100% de sensibilidade - Em 27 amostras do controle de qualidade, sabidamente positivas, foram comparadas e confirmadas. Todos os resultados foram satisfatórios, não apresentando falso-negativos.

Especificidade: 100% de especificidade - Em 273 amostras, do controle de qualidade, sabidamente negativas, foram comparadas e confirmadas. Todos os resultados foram satisfatórios, não apresentando falso-negativos.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- Reagentes somente para uso diagnóstico *in vitro*.
- O kit deverá ser conservado em geladeira entre 2 -8°C.
- A conservação das lâminas pode ser feita, selando as bordas da lâminula com esmalte de unha e guardando-as no escuro, entre 2 -8°C por, no máximo 2 meses.

4. Como se emprega azida sódica a 0,095% como conservante, o descarte dos reativos deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, a azida é tóxica quando ingerida.

- Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, anti-HCV e antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles como materiais potencialmente infecciosos.
- Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.
- Não usar fora do prazo de validade.
- Descartar o material conforme regulamentações locais.
- Realizar manutenção periódica do microscópio, pois a extrapolação da vida útil da lâmpada poderá prejudicar a análise do resultado.
- 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 a sexually transmitted disease (STD) caused by the spirochete, *Treponema pallidum*.

Other transmission ways are infected blood transfusion, which is rare today due to serological screening, and perinatal (congenital syphilis) that is transmitted 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, low fever, lymph nodes and exanthem , occurring in 75 to 100% of patients. On 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-treponemal such as VDRL (Veneral Disease Research Laboratory) and RPR (Rapid Plasma Reagin) and treponemal tests such as TPHA (Treponema pallidum Hemagglutination), FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) and ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

FTA-Abs is one of the most sensitive and specific test used on syphilis serology. However, false positive reactions are present in cirrhosis, genital herpes, SLE and , rarely, in pregnant women.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-treponemal antibodies on serum bind to an antigen-fixed slide and are identified by fluorescein-labelled, anti-human IgG conjugate.

KIT PRESENTATION

[**REF****]** **15060-I (60 determinations)**

- 5-well-slide *Treponema pallidum* (12 slides).
- Fluorescein-labelled, anti-human IgG conjugate (1x3ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (2 x 50ml)
- Mounting Medium (1x4ml)
- Absorbent solution (Treponema strain Reiter) (1x3ml)
- Positiive control serum (1x1ml)
- Negative control serum (1x1ml)
- Coverslips (12 units)
- Instructions for use.

[**REF****]** **15100-I (100 determinations)**

- 5-well-slide *Treponema pallidum* (20 slides)
- Fluorescein-labelled, anti-human IgG conjugate (1x5ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (3 x 50ml)
- Mounting Medium (1x4ml)
- Absorbent solution (Treponema strain Reiter) (1x5ml)
- Positive control serum (1x1ml)
- Negative control serum (1x1ml)
- Coverslips (20 units)
- Instructions for use.

STABILITY AND STORAGE

• **TREPONEMA PALLIDUM SLIDE (1):** Allow the pouch to equilibrate to room temperature for 15 minutes, then remove slide from the pouche. Stable if stored at 2°C to 8°C up to expiration date.

FLUORESC EIN-L AB E L E D , ANTI-HUMAN I G G C O N J U G A T E (2) : Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. Protect from light. Contains Sodium azide 0.095%

PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) (3):

Dilute PBS (0.01M; pH7.2 ± 0.2) 1:20 concentrated (Ex: 10ml of PBS + 190ml of distilled or deionized water). Stable if stored at 2-8°C up to expiration date in a clean and sealed container. Discard if turbidity or pH changing is present. Obs.: In case of PBS crystallization before diluting, keep it in water bath at 37°C up to a complete crystal dissolution.

MOUNTING MEDIUM (4): Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.

• **ABSORBENT SOLUTION (5):** Intended to remove non-specific anti-treponemal antibody. Ready for use. Shake before using it. Unknown serum should be diluted 1:5 in absorbent solution (Suggestion: 10µl of serum + 40µl of absorbent solution). Stable up to expiration date.

• **POSITIVE SERUM CONTROL (6):** Ready for use. Stable up to expiration date. Contains 0.095% Sodium azide.

• **NEGATIVE SERUM CONTROL (7):** Ready for use. Stable up to expiration date. Contains 0.095% Sodium azide.

Obs.: Kit presentes results after its first handling and it is stable up to expiration date if stored at 2-8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly haemolysis, lipaemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store the serum at 2-8°C for up to 72 hours. For long time storage, the serum should be stored at -20°C. Avoid repeated thawing and freezing of samples.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Fluorescence microscope and test tubes
- Serological pipette

- Coplin jar or similar
- Tubes 13x75mm and rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Incubation chamber
- Papertowel

PROCEDURE

- Inactivate the serum for 30 minutes at 56°C.
- Dilute the unknown serum 1:5 with absorbent solution (See STABILITY AND STORAGE). Allow for 15 minutes to equilibrate to room temperature.
- Allow the pouche to equilibrate to room temperature for 15 minutes, then remove slide from the pouche. Remove carefully the slide without touching on the substrate. Label it and store into moisture chamber.
- Add 1 drop of positive (6) and negative controls (7), on wells 1 and 2 respectively and 1 drop of unknown serum on the remaining wells.. Avoid overflowing the wells.
- Incubate the slide for 30 minutes at room temperature.
- Remove the slides from the incubation chamber. Hold the slide at tab end and rinse it with 10ml (PBS) (3). Using a pipette, lead PBS by the longitudinal edge of the slide. Be sure not to touch on the reagent wells to avoid damaging substrate. Transfer the slide into Coplin jar or similar and rinse three times with PBS for 5 minutes each time. Gently shake the jar during rinsing.
- Remove the slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of slide on a paper towel to remove PBS. Dry around reactive wells. To prevent slide from drying, go IMMEDIATELY to step 8.
- Place the slide back to incubation chamber. Apply 1 drop of Fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate on each well. Be sure to fill the well completely.
- Incubate the slide for 30 minutes at room temperature. Protect it from light.
- Repeat step 6.
- Remove the slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove PBS excess. Dry around the reactive wells. To prevent wells from drying, go IMMEDIATELY to step12.
- Apply 3 to 4 drops of Mounting Medium (4) on reactive wells. Cover the slips with coverslips avoiding air bubbles. Dry the Mounting Medium excess with a paper towel. Clean the slide reverse.
- The slide must be read under a fluorescence microscope as soon as possible. Otherwise, store the slide at 2-8°C, protect it from light and read it in the following day. The Mounting Medium should not dry, if necessary, apply more.

INTERPRETATION OF RESULTS

Negative: ABSENCE of yellow-greenish fluorescence on spirochete (T. pallidum). Spirochete is not easily seen.
Positive: PRESENCE of a typical yellow-greenish fluorescence on spirochete (T. pallidum).
OBSERVATION: Always check positive and negative controls for reaction control purposes.
INTERPRETATION
Negative serum are considered as **NEGATIVE**, and they are represented by non infected patients with titers lower than 1/5. Positive serum are considered **POSITIVE** and they are represented by infected patients by Treponema pallidum or previous infection with titers = or > to 1/5.
The majority of the cases, even after the disappearance of the disease, FTA-Abs is positive for some years.
Obs.: It is not recommended to submit positive samples to titration since through this method since high titers can persist for several years. This does not mean the patient is in any infection phase, that is, other methods such as VDRL or RPR can indicate better treatments associated to the patient’s health status. If the titration is needed, use indirect hemagglutination method (TPHA).

METHOD LIMITATION

The use of this method avoid possible unpecific answers, therefore, the results should be used in conjunction with available information from clinical evaluation and other diagnostic procedures.
The source of light, filters and optic from different microscopes of fluorescence can affect the test sensitivity.
PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Clinical and diagnostic sensitivity: 100% of sensitivity. 27 in-house positive specimens were compared and confirmed. All results were satisfactories. No false negative was found.
Specificity: 100% of specificity. 273 in-house negative specimens were compared and confirmed. All results were satisfactories. No false positive was found.
PRECAUTIONS AND WARNINGS

- For in vitro diagnostic use only.
- The kit should be stored at 2°C to 8°C.
- For a better slide storage, seal the coverslip edge with nail varnish and store at 2-8°C in a dark room up to 2 months.
- Sodium Azide 0.095% is used and it can react with lead and cooper plumbing forming highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide is toxic if ingested .
- All human components have been tested for HBsAg, anti-HIV, anti-HCV and found to be negative. However, this does not assure the absence of these and other infectious diseases. All human components should be handled as potentially hazardous.
- Do not interchange kit components with those from sources other than the same code number from WAMA Diagnostica.
- Do not use components beyond their expiration date.

- Disposal in accordance with local regulations.
- The periodical maintenance of the microscope is recommended since on expired lamp can interfere in the result analysis.
- Follow the good laboratory practices (GLP) related to storage, dispensing 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 replace 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*. 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 suerológica de rutina, y la perinatal (sífilis congénita) transmitida in útero, por los treponemas procedentes de la madre infectada para el feto en desarrollo. Clínicamente, después de un periodo de incubación que varía de 10 a 90 días, pues es inversamente relacionado a la cantidad del inoculado, ocurre, en 85% de los pacientes, el surgimiento de un cancro, que es una lesión solitaria y indolora, caracterizando la sífilis primaria. Aproximadamente 4 a 10 semanas después del apareamiento del cancro, surgen frecuentemente síntomas como pérdida de peso, cefalea, anorexia, mialgia, artralgia, mal estar, poca fiebre, linfadenopatía generalizada y exantema (presente en 75 a 100% de los casos), el que caracteriza la sífilis secundaria. Pueden ocurrir también en esta etapa manifestaciones primarias o secundarias, ocurre el período conocido como sífilis latente, caracterizado por teste suerológicos positivos y ausencia de hallados clínico. Puede 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%). Os teste suerológico para sífilis son clasificados como no-treponémicos , usados mas comúnmente para la selección como el VDRL (Venereal Disease Research Laboraotry) y el RPR (Rapid Plasma Reagin), y treponémicos, usados como testes confirmatorios para sueros reactivos en los testes de selección , como el TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination), FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption) y ELISA (Enzyme-Linked Imunosorbent Assay).

El FTA-Abs es um sensible y específico teste empleados en suerología de la sífilis. Pero, pueden ocurrir reacciones falso-positivas en cirrosis, herpes genital, lupus eritematoso sistémico y, muy raramente en mujeres embarazadas.
PRINCIPIO DO MÉTODO
Los anticuerpos presentes en el suero se ligan al antígeno fijado en la lamina y son revelados por una antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína.

PRESENTACIÓN DEL KIT

[REF] 15060-I (60 determinaciones)

- Laminas con 5 áreas reactivas con suspensión de *Treponema pallidum* (12 laminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (1x3ml).
- Tapón fosfato-salino (PBS) (2x50ml)
- Glicerina taponada (1x4ml)
- Solución absorbente (Treponema cepa Reiter) (1x3ml)
- Suero control positivo (1x1ml)
- Suero control negativo (1x1ml)
- Laminuelas (12 unidades)
- Instrucciones para el uso

[REF] 15100-I (100 determinaciones)

- Laminas con 5 áreas reactivas con suspensión de *Treponema pallidum* (20 laminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (1x5ml).
- Tapón fosfato-salino (PBS) (3x50ml)
- Glicerina taponada (1x4ml)
- Solución absorbente (Treponema cepa Reiter) (1x5ml)
- Suero control positivo (1x1ml)
- Suero control negativo (1x1ml)
- Laminuelas (20 unidades)
- Instrucciones para el uso

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS
- **Laminas con suspensión de treponema (1):** dejar en temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirarlas del sobre. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.
-**Antigamaglobulina Humana (IgG) Marcada (2):** Lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad. Proteger de la luz. Contiene azida sódica 0,095%.
-**Tapón Fosfato-Salino (PBS) (3):** diluir el PBS (0,01M;pH 7,2 mas o menos (0,2) concentrado 1/20 (Ex.: 10 ml de PBS +190ml de agua destilada o deionizada). Conservar en nevera en recipiente limpio y bien vedado. Despresar la solución si ocurrir cambios de pH o turbación. Estable hasta la fecha de caducidad.

Obs.: Caso ocurra cristalización del PBS antes de su dilución, colocar en remojo a 37°C hasta la completa disolución de los cristales
-**Glicerina taponada (4):** lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.

Solución Absorbente (5): para remoción de anticuerpos anti-treponema inespecificos. Lista para el uso. Agitar antes de usar. Los sueros desconocidos deberán ser diluidos en solución absorbente en la proporción 1/5 (se sugiere 10µl de suero + 40µl de la solución absorbente). Estable hasta la fecha de caducidad.

-**Suero Control Positivo (6):**Listo para el uso. Estable hasta la fecha de caducidad. Contiene azida sódica 0,095%.

-**Suero Control Negativo (7):** Listo 0,095%.

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.

MUESTRAS

Suero libre de hemolise, lipemia y contaminación. Los sueros pueden ser conservados en nevera (2-8°C) hasta 72 horas. Para un tiempo mayor, deben ser guardados en congelador -20°C.Evitar repetidos congelamientos y descongelamientos.

MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO

- Microscopio de fluorescencia
- Tubos de ensayo
- Pipetas suerológicas
- Jarra de Coplin o similar
- Tubos 13x75 mm y rack
- Agua destilada o deionizada
- Frasco para un litro
- Cámara de incubación
- Papel absorbente

PROCEDIMIENTO

- Inactivar el suero por 30 minutos, a 56°C.
- Diluir los sueros desconocidos 1/5 con la solución absorbente (ver Preparación de los Reactivos).Dejar 15 minutos en temperatura ambiente.
- Dejar as laminas atingieren la temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirarlas del sobre. Removerlas sin tocar en el substrato, rotularlas y colocarlas en cámara húmeda.
- Pingar 1 gota de los controles positivo y negativo en áreas 1 y 2 de las laminas, respectivamente y del suero desconocidos, en áreas restantes, evitando transbordar en el área.
- Incubar en la cámara húmeda por 30 minutos, en temperatura ambiente.
- Remover las laminas de la cámara húmeda. Aguantarlas por una extremidad y lavarlas con aproximadamente 10 ml de tapón fosfato-salino (PBS) (3). Usando una pipeta dirigir el PBS por la borda longitudinal de la lamina, teniendo el cuidado de no atingir directamente áreas reactivas, evitando, con eso, perjudicar el substrato. Colocar las laminas en una jarra de Coplin o similar y lavar 3 veces con PBS, 5 minutos cada vez, agitando suavemente el Coplin algunas veces durante cada aclaración.
- Remover las laminas del Coplin, una de cada vez. Sacar el exceso de PBS, sacudiendo las sobre el papel absorbente. Secar en torno de áreas reactivas y pasar inmediatamente para la etapa 8 para no secar el local de la reacción.
- Retornar a la cámara húmeda. Pingar 1 gota de la antigamaglobulina marcada en cada área de las laminas teniendo el cuidado de cubrirlas totalmente.
- Incubar en cámara húmeda por 30 minutos, en temperatura ambiente, protegiendo de exceso de luz.
- Repetir la etapa 6.
- Remover las laminas del Coplin, una de cada vez. Sacar el exceso de PBS, sacudiéndolas sobre papel absorbente. Secar en torno del área reactiva y pasar inmediatamente para la etapa 12 para no secar el local de la reacción.
- Pingar 3 a 4 gotas de glicerina taponada (4) entre áreas reactivas. Cubrir las laminas con laminuelas, evitando la formación de burbujas. Secar el exceso de glicerina con papel absorbente. Limpiar el dorso de la lamina.
- Leer en microscopio de fluorescencia. Conviene hacer la lectura en el mismo día. Pero, en el caso de no ser posible, conservarlas en nevera (2-8°C), protegidas de la luz y leerlas en el día siguiente. La glicerina no debe secar. Si esto ocurrir colocar mas glicerina.

RESULTADO DE LAS LECTURAS

Reacción negativa: Ausencia de fluorescencia amarillo verdoso en el espiroqueta (*T. pallidum*). Generalmente no se observa espiroqueta o se muy tenue.

Respuesta positiva: Presencia de fluorescencia amarillo verdoso caracterizada en la espiroqueta (*T. Pallidum*).

Observación: Examinar siempre los controles positivo y negativo para control de la reacción.

INTERPRETACIÓN

Sueros que dan reacción negativa son informados como no reactivos y significan individuos no infectados.

Sueros que dan reacción positiva son informados como reactivos y significan individuos infectados por el *Treponema pallidum* o infección progresa. En la mayoría de los casos mismo después de la cura de la enfermedad, el FTA-Abs persiste reactivo por varios años.

Obs. No se recomienda titular muestras positivas a través de este método, pues títulos alto pueden persistir por varios años. Esto no significa que el paciente se encuentre en cualquier fase de infección, o sea otros métodos como VDRL o RPR, que son tests no treponémicos, pueden indicar mejores situaciones de tratamiento aliados a la clínica de este paciente, en caso de que sea necesaria la titulación utilice métodos como hemaglutinación indirecta (TPHA).

LIMITACIONES DEL MÉTODO

El uso de este método evita posibles respuestas no específicas, sin embargo, los resultados deben ser usados conjuntamente con informaciones disponibles

en el caso de evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos.

La fuentes de luz, filtros y la óptica de las diferentes marcas de microscopios de fluorescencia influenciarán la sensibilidad de los tests.

DESEMPEÑO DEL TEST

Sensibilidad clínica o diagnóstica: 100% de sensibilidad - En 27 muestras, de control de calidad, que se saben positivas, fueron comparadas y confirmadas. Todos los resultados fueron satisfactorios, sin presentar falsos negativos.

Especificidad: 100% de especificidad - En 273 muestras, de control de calidad, que se saben negativas, fueron comparadas y confirmadas. Todos los resultados fueron satisfactorios, sin presentar falsos positivos.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Reactivos solamente para uso diagnóstico in vitro.
- Las laminas deben ser conservadas en congelador a -20°C, evitando el congelamiento y descongelamiento. El restante del kit debe ser conservado en nevera entre 2-8°C.
- La conservación puede ser hecha sellando las bordas de la laminuela con esmalte de uña y guardándolas en el oscuro entre 2-8°C por, en el minino 2 meses.
- Como se emplea azida sódica a 0,095% como conservante, el descarte de los reactivos deben ser acompañados de grandes volúmenes de agua para evitar el acumulo de residuos de azida en las tuberías, pues esta pode reaccionar con el plomo o cobre formando sales altamente explosivos. Además la acida es tóxica, cuando ingerida.
- Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueron testados, con resultados negativos para anticuerpos anti-VIH, anti-HCV y antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), pero como ningún método diagnóstico ofrece completa seguridad de la ausencia de eses y de otros agentes infecciosos, recomendamos tratar los sueros controles como materiales potencialmente infecciosos.
- No sustituir componentes de este Kit con los de otros fabricantes ni usar componentes de lotes y códigos diferentes.
- No usar fuera del plazo de caducidad.
- Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locales.
- Realizar un mantenimiento regular del microscopio, ya que la extrapolación de la vida de la lámpara podían afectar el análisis de los resultados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en la conservación , manoseo y descarte de los materiales.

TÉRMINO DE GARANTIA

La WAMA Diagnostica garantiza el cambio de este conjunto diagnostico si desde el momento que el mismo esté dentro el plazo de caducidad y sea comprobado por su accesoría 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

- Center for Disease Control (1988). Recommendation for diagnosing and treating Syphilis in HIV-infected patients, MMWR Morb. MortalWkly Rep. 37:601
- Fraser CM et al (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis spirochete, Science 281: 324-325
- Johnson PC, Farnie MA (1994). Testing for Syphilis. Dermatologic Clin. 12(1): 9-17.
- Marx Retal (1991). Crack, sex and STD. Sex Transm Dis 18(2):92-101.
- Wasserheit JN (1992). Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. Sex Transm Dis. 19(2):61-77

SIMBOLOGIA/ SIMBOLS / SIMBOLOGIA

	O conteúdo é suficiente para (n) tests Quantity sufficient for (n) tests O contenido es suficiente para (n) tests		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 Europeo		Fabricado por Manufactured by Fabricado por