

Instruções de Uso

Inmunofluor FTA / Abs

Teste de imunofluorescência indireta para a determinação de anticorpos contra o *Treponema pallidum* em soro humano e líquidos biológicos.

70 - 140 determinações

USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Introdução

A sífilis é uma doença infecciosa sistêmica causada pelo *Treponema pallidum*, que se caracteriza clinicamente por uma lesão primária, uma erupção secundária que afeta a pele e as membranas mucosas, longos períodos de latência e lesões tardias na pele, ossos, vísceras e sistema nervoso central e cardiovascular. A lesão primária aparece cerca de 3 semanas depois da exposição, em forma de pápula no local de invasão inicial; depois se ulcera e apresenta diversas formas, entre as quais a mais típica, embora não seja a mais freqüente, é um cancro duro.

A invasão na corrente sanguínea precede o surgimento da lesão primária e em geral esta é seguida por uns botões satélites duro, fixos e indolor. Ao final de 4 a 6 semanas, mesmo sem tratamento específico, começa a involução do cancro e pode surgir uma erupção secundária generalizada acompanhada de sintomas orgânicos leves. As manifestações secundárias desaparecem espontaneamente em um período que varia desde algumas semanas até 12 meses, seguidas por um estado de latência clínica que pode durar semanas ou anos. Nos primeiros anos pode ocorrer uma recorrência de lesões infecciosas na pele e nas mucosas ou desenvolvimento de lesões nos olhos e no sistema nervoso central. As vezes, este estado de latência dura toda a vida; outras vezes ocorre uma cura espontânea. Em outros casos, ocorrem de modo imprevisível lesões incapacitantes no sistema cardiovascular e no SNC. Podem surgir lesões destrutivas (não infecciosas), na pele, vísceras, ossos e superfícies mucosas.

A sífilis precoce adquirida não é mortal nem produz incapacidade grave, mas as manifestações tardias ameaçam a vida, afetam a saúde e limitam a produtividade do indivíduo.

As infecções fetais ocorrem com muita frequência no caso de infecção primária materna não tratada. As manifestações clínicas podem estar presentes no nascimento, mas em geral são observadas entre a terceira semana e 6 meses de idade. Os sintomas de uma sífilis congênita precoce incluem uma erupção cutânea, lesões na membrana mucosa, anemia e osteocondrite dolorosa localizada nos ossos grandes. As manifestações tardias da sífilis congênita incluem cegueira, deformação de ossos e dentes, surdez e goma.

A sorologia é um aspecto crítico no diagnóstico de sífilis. São utilizados dois tipos de testes diferentes:

- a) provas com antígenos não treponêmicos (VDRL, RPR, etc.)
- b) provas com antígenos treponêmicos (FTA - Abs, imobilização de *T. Pallidum*, hemoaglutinação, etc.)

A reação **Inmunofluor FTA / ABS** é um método confirmatório para o diagnóstico de sífilis. Sua alta sensibilidade e especificidade já foram demonstradas e é recomendada como técnica confirmatória, em investigações prévias a técnicas inespecíficas.

Em 1941(1), Deancon, Falcone e Harris (2) investigaram antígenos do *Pneumococo* em tecidos e em 1957, desenvolveram uma prova de detecção de anticorpos treponêmicos para sífilis, usando imunofluorescência com anti-gamaglobulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína. Em 1960, Deacon e Col. (3), minimizaram a incidência de falsos positivos do método, introduzindo na reação uma diluição do soro 1/200 (FTA-200).



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

O atual procedimento de FTA-Abs foi desenvolvido em 1964 por Hunter e Col. (4), como uma modificação do teste original FTA de Deacon. Hunter (4) demonstrou que a não especificidade da prova FTA era causada por antígenos comuns a muitos *Treponemas* e que a absorção dos anticorpos comuns de cultivos de *Treponemas* em indivíduos portadores de sífilis, conjuntamente com a diluição 1/5 do soro problema, apresentava uma grande sensibilidade e especificidade.

Fundamentos do método

A técnica de anticorpos fluorescentes fundamenta-se na capacidade dos anticorpos de unir-se a determinados corantes fluorescentes sem alterar suas propriedades imunológicas. Isto permitiu desenvolver métodos de testes com grande aplicação no diagnóstico sorológico de diversas enfermidades. O teste de anticorpos fluorescentes **Inmunofluor FTA / ABS** utiliza o método indireto, descrito por Weller e Coons em 1954. O procedimento é formado por duas reações. Na primeira etapa, o soro do paciente é colocado em contato com o substrato antigênico. Se os anticorpos estiverem presentes no soro, estes se ligam ao antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo. Se o soro testado não contém anticorpos dirigidos contra este antígeno em particular, não se formará o complexo antígeno-anticorpo e todos os componentes do soro serão eliminados na etapa de lavagem. Na segunda etapa adiciona-se uma antigamaglobulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína. Na segunda etapa, se o complexo antígeno-anticorpo formou-se na primeira etapa, a antigamaglobulina marcada fluoresceína adere-se ao mesmo. Poderá ser observada uma reação positiva, com fluorescência verde maçã brilhante, através de um microscópio de fluorescência.

Procedimento

1. Reconstituir o tampão salina fosfato (PBS) por diluição em 1 litro de água destilada. Conservar o tampão reconstituído entre 2-8° C.
2. Retirar as lâminas necessárias para trabalhar e deixar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Preparar uma diluição 1/5 dos soros controles e das amostras com o absorvente. Por exemplo: 10 µl de amostra + 40 µl do absorvente.
4. Cobrir generosamente as áreas reagentes com as respectivas diluições do controles positivo, negativo e das amostras.
5. Incubar na câmara úmida 30 minutos à temperatura ambiente.
6. Lavar com PBS, em duas etapas de lavagem com duração de cinco minutos cada uma.

Colocar as lâminas na jarra de Coplin contendo PBS, agitando suavemente durante as etapas de lavagem.

7. Diluir a antigamaglobulina total humana marcada com isotiocianato de fluoresceína no PBS, de acordo o título indicado no frasco (Por exemplo, Título: 1/100 - Colocar 0,01 ml de antigamaglobulina em 1 ml de PBS).

Título:

8. Secar cuidadosamente as bordas laterais externas da lâmina com papel absorvente, mantendo úmidas as áreas reagentes.
9. Cobrir cada área reagente com a diluição de anti-gamaglobulina e incubar no câmara úmida 30 minutos à temperatura ambiente.
10. Repetir os passos 7 e 9.
11. Colocar o meio de montagem sobre a lâmina e cuidadosamente cobrir a área reagente com a lamínula sem pressionar fortemente



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

NOTA: Para obter bons resultados, recomenda-se ler imediatamente no microscópio de fluorescência. Se as lâminas forem conservadas, selar suas para prevenir a secagem do meio de montagem e estocar entre 2-8° C ao abrigo da luz.

Instruções de armazenagem

Os kits reagentes são estáveis até data de validade marcada na embalagem, não podendo ser utilizados após a mesma.

Conservar o kit reagente entre 2-8°C.

Componentes do kit reagente

1. Lâminas com 7 áreas reagentes cada uma, sendo 2 áreas para controles e 5 áreas para amostras. Cada área reagente contém suspensão de *Treponema pallidum*, cepa Nichols (aproximadamente 10.000 a 15.000 *Treponemas* por poço, ou seja, 10 µl).

- 20 lâminas - Para 140 determinações
- 10 lâminas - Para 70 determinações

2. Anti-gamaglobulina total humana marcada com isotiocianato de fluoresceína. Diluir de acordo com o título 1/600, mas pode estar entre 1/3000 a 1/6000.

- 1 frasco x 0,30 ml - Para 140 determinações
- 1 frasco x 0,20 ml - Para 70 determinações

3. Soro humano controle positivo - Diluir como as amostras.

- 1 frasco x 0,30 ml - Para 140 determinações
- 1 frasco x 0,20 ml - Para 70 determinações

4. Soro humano controle negativo - Diluir como as amostras.

- 1 frasco x 0,30 ml - Para 140 determinações
- 1 frasco x 0,20 ml - Para 70 determinações

5. Absorvente preparado de cultivo de *Treponema* cepa Reiter para remover os anticorpos treponêmicos nos sífilíticos.

- 1 frasco x 5 ml - Para 140 determinações
- 1 frasco x 2,5 ml - Para 70 determinações

6. Tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2 ± 0,2. Frasco para reconstituir com 1 litro de água destilada.

- 5 frascos para 70 determinações
- 3 frascos para 70 determinações

7. Meio de montagem (glicerina tamponada 9 partes, com tampão fosfato pH 7.2 1 parte e azida sódica 0,01%) - 1 frasco x 5 ml. Pronto para uso.



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

8. Lamínulas

- 20 - Para 140 determinações
- 10 - Para 70 determinações

Estabilidade dos reagentes reconstituídos

O tampão fosfato salino reconstituído é estável até 15 dias, se conservado entre 2-8°C.

Para períodos mais prolongados de armazenamento, adicionar 0,1% de azida sódica, para evitar contaminações.

Material necessário, mas não fornecido

1. Água destilada ou deionizada para preparo do PBS
2. Tubos para hemólise (ou semelhantes) e estantes para tubos
3. Pipetas para preparar as diluições
4. Câmara úmida
5. Proveta de 1 litro
6. Jarras de Coplin ou semelhantes
7. Timer de 0 a 60 minutos
8. Microscópio de Fluorescência equipado adequadamente
9. Esmalte para unhas para selar as lâminas

Coleta das amostras

1. O desempenho ótimo do teste IFI do kit reagente **Inmunofluor FTA-Abs** depende do uso de amostras de soro frescas. Deve ser evitado o uso de soros hemolisados, lipêmicos ou contaminados.
2. Se o soro for testado até 3 dias após a coleta, estocar entre 2-8° C.
3. Para períodos de armazenamento mais prolongados, congelar a -20°C. Evitar ciclos de congelamento-descongelamento repetidos das amostras, considerando que isto pode induzir a uma deterioração dos anticorpos.
4. Ocasionalmente, as amostras podem conter enzimas proteolíticas, as quais digerem o substrato. Em geral, isto ocorre com amostras contaminadas com microrganismos. A inativação por calor a 56°C durante 30 minutos, reduz a atividade enzimática.

Interpretação dos resultados

Crítérios de leitura e recomendações

Crítério de positividade: Em caso de soros positivos os treponemas se observam corados com uma típica fluorescência verde maçã.



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

Critério de negatividade:

a) Ausência total de fluorescência

As espiroquetas podem ser observados em campo escuro com a adição de laranja de acridina sob microscópio de fluorescência.

b) Coloração muito fraca

Reação Indeterminada: Existem reações FTA Abs com resultados indeterminados. Uma reação indeterminada em amostra de um paciente significa que o resultado não pode ser interpretado como positivo nem como negativo. Se for a primeira amostra, deve ser feito um novo teste FTA Abs em uma segunda amostra do paciente. Se a segunda amostra apresentar o mesmo resultado indeterminado, não é possível estabelecer de modo definitivo se o paciente apresenta ou não, prova sorológica de infecção sífilítica. Neste caso sugere-se utilizar uma técnica alternativa (ELISA, MHATP) e realizar um estudo cuidadoso do histórico do paciente e dos sinais físicos, baseando-se no diagnóstico em evidências clínicas.

Gradientes de intensidade de fluorescência

A intensidade de fluorescência pode ser semiquantificada de acordo a seguinte norma, estabelecida pelo CDC - "Centro de Controle de Doenças" de Atlanta, Georgia.

- 4 (+) Fluorescência máxima: verde maçã brilhante.
- 3 (+) Fluorescência verde maçã brilhante luminosa.
- 2 (+) Fluorescência verde maçã definida clara.
- 1 (+) Fluorescência verde maçã opaca, porém diferenciável.
- 0 Não fluorescente ou sem fluorescência visível.

Controle de qualidade

Devem ser incluídos controles positivos e negativo em cada teste. Para que o teste seja validado, deve comprovar-se que os resultados para os controles estão corretos.

Origem dos padrões utilizados

*Fluorescein Isothiocyanate (FITC) labelled sheep anti-human Immunoglobulin for the demonstration of specific antibodies in human serum/CLB, Amsterdam/WHO International Standard.

*The International standard for syphilitic human serum (1st International standard preparation / Statens Serum Institut WHO/ Denmark).

Características do sistema

Sensibilidade

A sensibilidade do teste **Inmunofluor FTA / Abs** é dependente do estágio da doença Podem ocorrer resultados falsos negativos em laboratório no caso de infecção precoce, antes dos anticorpos se desenvolverem. O teste **Inmunofluor FTA / Abs** torna-se positiva uma semana após o surgimento da lesão primária, e os títulos permanecem altos na latência e após o tratamento.



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

Sensibilidade comparativa em diferentes métodos sorológicos em sífilis não tratada (% de positividade)

ESTÁGIO DA DOENÇA	PROVAS NÃO TREPONÊMICAS	PROVAS TREPONÊMICAS	
		FTA-Abs	MHA-TP
	(VDRL-RPR)		
PRIMÁRIO	50-70%	80-90%	70-80%
SECUNDÁRIO	99%	99-100%	99-100%
TERCIÁRIO	60-75%	98%	98%

Especificidade

A absorção do soro com cultivos de *Treponemas* não sífilíticos remove anticorpos dirigidos contra outras espécies de treponema, diferentes de *T. Pallidum*, outorgando alta especificidade ao **Inmunofluor FTA / Abs.**

Podem ser encontrados resultados falsos positivos biológicos em pacientes com doenças crônicas tais como lepra, malária, colagenopatias e doenças auto-imunes.

As recomendações da OMS são de realizar o screening diagnóstico com provas tais como VDRL e RPR e utilizar o teste FTA Abs como uma técnica confirmatória.

Potência

A potência das preparações locais de antigamaglobulina total marcada com isotiocianato de fluoresceína foi medida em relação ao Padrão Internacional "Fluorescein Isothiocyanate (FITC) labelled sheep anti-human immunoglobulin for the demonstration of antibodies in human serum" /CLB, Amsterdam /WHO INTERNATIONAL STANDARD. Atividade das antigamaglobulinas totais FITC locais, em comparação com o padrão internacional: 4000-8000 IU/ml.

Através da padronização com o padrão internacional, assegura-se a uniformidade do teste, estabelecendo padrões de trabalho internos positivos e negativos, úteis em controle de qualidade da metodologia.

Estabilidade

Se a temperatura de estocagem for constante, os reagentes contidos no kit reagente são estáveis até a data de validade impressa nos rótulos internos e externos, não podendo ser utilizados após esta data.

Precauções

1. Os componentes de soro humano utilizados na preparação dos controles deste kit reagente apresentaram resultados não reagentes para a presença de antígeno de superfície de Hepatite B (HBsAg), anticorpos anti-vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) e Hepatite C. Considerando-se que nenhum teste diagnóstico pode oferecer uma segurança absoluta a respeito da ausência dos vírus HIV e Hepatite B ou outros agentes infecciosos, as amostras e os reagentes fabricados com materiais de origem humana devem ser tratados como potencialmente infectantes.
2. Não usar os reagentes contidos no kit reagente após a data de validade impressa na embalagem.
3. Todas as incubações devem ser realizadas em câmara úmida.



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

4. Devem ser mantidas úmidas as áreas reagentes durante toda a técnica (evitar qualquer técnica de secagem artificial como: secagem ao ar com estufa e/ou secadores). Após as etapas de lavagem, recomenda-se remover o excesso de umidade com papel absorvente; secar apenas nas bordas laterais externas das lâminas, sem secar entre as áreas. Cobrir imediatamente, generosamente com a diluição conveniente de antigamaglobulina e/ou com o meio de montagem, de acordo com a etapa correspondente.

5. Alguns dos componentes deste kit reagente contém azida sódica como conservante. Há relatos que a azida sódica pode reagir com o chumbo e o cobre das tubulações de água formando compostos explosivos. Ao se descartar os reagentes, deixar fluir água em abundância para evitar a formação destas azidas metálicas explosivas.

6. Nunca pipetar com a boca ou permitir que amostras de pacientes entrem em contacto com a pele.

7. Todos os materiais usados neste teste, incluindo-se os reagentes, amostras e materiais para limpeza devem ser descartados de maneira que se inativem os agentes infecciosos. Recomenda-se utilizar na descontaminação, hipoclorito de sódio a 1%, durante um período de tempo igual ou acima de 30 minutos.

8. Somente para uso diagnóstico in vitro.

Limitações

1. O usuário do kit reagente deve realizar uma cuidadosa leitura e compreensão destas instruções de uso. O cumprimento exato do protocolo é indispensável para se obter resultados confiáveis.

2. Existem reações FTA Abs com resultados indeterminados. Uma reação indeterminada em uma amostra de paciente significa que o resultado não pode ser interpretado com reagente e nem como não reagentes. Se for a primeira amostra, deve ser feita uma nova reação FTA Abs em uma segunda amostra do paciente. Se a segunda amostra também apresentar o mesmo resultado indeterminado, não será possível estabelecer de maneira definitiva se o paciente apresenta ou não prova sorológica de infecção sífilítica. Neste caso, sugere-se utilizar uma técnica alternativa (ELISA, MHATP) e realizar um estudo cuidadoso do histórico do paciente e dos sinais físicos, baseando o diagnóstico nas evidências clínicas.

3. O excesso de lipídeos no soro a testar produz uma reação "filming" (película que recobre a reação específica). Um técnico experiente e treinado com capacidade de diferenciar uma reação "filming" de uma reação específica.

4. A intensidade e reatividade do ponto final de uma reação em técnica de IFI podem ser afetadas pelo microscópio de fluorescência utilizado.

5. Existem dois tipos de reações falso positivo na técnica FTA Abs: umas relacionadas com fenômenos biológicos ocorridos no paciente e outras relacionadas com a condição clínica do paciente. Neste último grupo, as doenças do tipo auto-imune, fundamentalmente o lupus eritematoso sistêmico (LES), são as mais comuns. Em pacientes com LES, podem ser observados dois tipos de reação positiva com a técnica FTA Abs, uma delas apresenta um padrão de coloração em forma de "contas de rosário" e a outra um padrão de coloração homogêneo. Em todos estes casos, sugere-se realizar um outro teste, com técnicas alternativas tais como MHATP ou ELISA.

Bibliografia

1) Coons PH, Creech H.J. Jones R.N.; et al: The demonstration of pneumonical antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J. Immunol 45: 159-170, 1942.

2) Deacon WE, Falcone V. H., Harris A: A Fluorescent test for treponemal antibodies. Prod. Soc. Expl. Biol. Med. 96: 477-480. 1957.

3) Deacon WE, Freenan EH, Harris A. Fluorescent Treponemal antibody test. Modification based on quantitation (FTA-200) Proc. Soc. Expl. Biol. E Med. 103:827-829, 1960.

4) Hunter EF, Deacon WE, Meyer PE: An Improv. FTA test for syphilis. The absorption procedure (FTA-Abs.) test. Pub Health Reots 79: 410-412. 1964.



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br

- 5) Benenson S. Abram; Informe Oficial de la Asociación Americana de Salud Pública: "O control de las doenças transmissibles no hombre". Publicação científica N 442,1980
- 6) Hunter, E.G., R.M. Mc Kinney, S.E. Maddison, and D.D. Cruce. 1979. Double - staining procedure of the fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-Abs) test. Br. J. Vener. Dis. 55: 105-108.
- 7) Crissy, J.T., and D.D. Denenholz. 1984. Syphilis. Clin. Dermatol. 2: 1-166.
- 8) Antal, G.M. 1979. Present status of therapy and serodiagnosis of syphilis (some selected aspects). W.H.O. document W.H.O./ V.D.T./ Res. 70: 359.
- 9) Manual de reacções para diagnóstico de sífilis. OMS (1975).

Fabricado por:

Biocientífica S.A.
Iturri 232/4
Caixa Postal C1427ADD
Buenos Aires - ARGENTINA

"SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO"

POTENCIALMENTE INFECTANTE

Conservar entre +2 e +8°C.
Para maiores informações, vide Instruções de Uso.

REG. MS N°: 80189860054

Revisão Setembro/2004



INTERLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A.
Praça Isaac Oliver, 342 - São Paulo - SP - Brasil
Depto. Científico: Fone: (11) 5564-9527 - Fax: (11) 5564-9520
e-mail: interlab@interlabdist.com.br