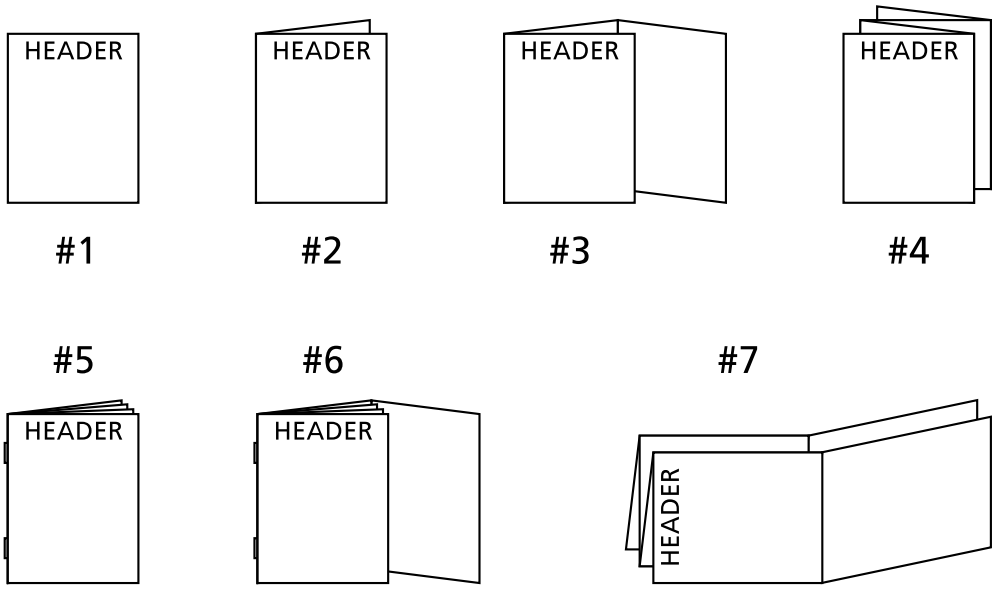
Revisions				SO 0046-2
Rev From	Rev To	ECO #	Date	Appr.
0803	1103	2404-03		

Notes

1. BD Cat. No. 224491, 224492, 223441, 232591, 232592, 232661, 224391, 224401
2. Blank (Sheet) Size : Length: 18" Width: 36"
   Number of Pages (panels): 12 Number of Sheets: 1
   Page Size: Length 18" Width 6" Final Folded Size: 2.25" x 6"
3. Style (see illustrations below): #4



4. See Specification Control No. S1333 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides [X] Yes [ ] No
   No. of Colors: 1 PMS# 2755
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design Date Proofer Date Checked By Date Part Number: S1333		BD Becton, Dickinson and Company 250 Schilling Circle Cockeysville, MD. 21030-0243 USA	
	Category and Description Package Insert FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	Sheet: 1 of 13 Scale: 1:1	A

BD Difco™ FTA Antigen
Difco™ FTA Serum Reactive
Difco™ FTA Serum Non-Reactive
Difco™ FTA Sorbent
Difco™ FTA Sorbent Control
Difco™ FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco™ Tween™ 80
Difco™ FA Buffer, Dried
Difco™ FA Mounting Fluid pH 7.2

CE S1333 2003/11

See symbol glossary at end of insert. / Se symbolglossaret i slutningen af indlægssedlen. / Voir le glossaire des symboles à la fin de la notice. / Siehe Symbol-Erklärungen am Ende der Packungsbeilage. / Δείτε το γλωσσάριο των συμβόλων στο τέλος του ένθετου. / Vedere il glossario dei simboli alla fine del foglio illustrativo. / Consulte o glossário de símbolos no fim do folheto informativo. / Consulte el glosario de símbolos al final del prospecto. / Se symbolförteckningen vid slutet av bipacksedeln.

Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner.

INTENDED USE

These reagents are used in the FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption) Test. The FTA-ABS test is an indirect fluorescent antibody procedure for detecting human antibody against *Treponema pallidum*, the causative agent of syphilis.

Difco FTA Reagents are not FDA cleared (approved) for use in testing (i.e., screening) blood or plasma donors.[1]

SUMMARY AND EXPLANATION

Treponema pallidum is the causative agent of syphilis, a chronic infection with many clinical manifestations. These manifestations occur in distinct stages and detection of each stage requires different laboratory tests.

Since the clinical manifestations of syphilis can be confused with other infectious diseases or with noninfectious conditions that cause skin lesions, proper diagnosis must be based on microscopic examination of lesion material and serological test results.[2]

The FTA-ABS test is a standard diagnostic test for syphilis as defined by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Other standard treponemal tests include the Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption Double Staining Test (FTA-ABS DS) and the Microhemagglutination Assay for Antibodies to *Treponema pallidum* (MHA-TP).

Treponemal antigen tests, such as the FTA-ABS test, are used as confirmatory tests in diagnostic cases when the initial nontreponemal test is reactive. The FTA-ABS test also has utility with patients for whom the clinical, historical or epidemiological evidence of syphilis disagrees with nontreponemal tests. The persistent reactivity of the FTA-ABS test to a treated case of syphilis, sometimes for life, minimizes its use for following response to therapy. Therefore, the FTA-ABS test is also unreliable in detecting new untreated cases in epidemiological investigations. The test should not be used as a routine screening procedure.[3,4] The likelihood of obtaining a reactive FTA-ABS test result in various stages of untreated syphilis has been reported as follows:[2]

Stage of Untreated Syphilis	% Reactive
Primary	84
Secondary	100
Latent	100
Tertiary (Late)	96

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Patient serum is diluted 1:5 in sorbent and layered on a microscope slide fixed with *T. pallidum*. If the patient's serum contains antibodies, these antibodies will coat the treponemes on the slide. Fluorescein-labeled antihuman immunoglobulin is added. It combines with the patient antibodies already adhering to the *T. pallidum* and produces fluorescein-stained spirochetes that can be observed with a fluorescence microscope.[5,6]

REAGENTS

Difco FTA Antigen (also known as *T. pallidum* antigen) is a lyophilized, standardized, killed suspension of *T. pallidum* (Nichols strain).

Difco FTA Serum Reactive is lyophilized, standardized syphilitic human sera containing 0.02% thimerosal as a preservative. It is used to prepare:

Reactive Control Serum (4+) – Unabsorbed
Reactive Control Serum (4+) – Absorbed
Minimally Reactive Control Serum (1+)

It is used as a positive control in the FTA-ABS test.

Difco FTA Serum Non-Reactive is lyophilized, standardized, non-syphilitic human sera containing 0.02% thimerosal as a preservative. It is used to make Nonreactive Control Serum (N). It is used as a negative control in the FTA-ABS test.

Difco FTA Sorbent is a lyophilized, standardized extract of the nonpathogenic Reiter treponeme *(Treponema phagedenis)* prepared from broth culture. It is used to remove nonpathogenic treponeme antibodies during preparation of the test specimen.

Difco FTA Sorbent Control is lyophilized, standardized, non-syphilitic human sera containing 0.02% thimerosal as a preservative. It is used to make Nonspecific Control Serum – Unabsorbed, which demonstrates at least 2+ nonspecific reactivity at a 1:5 dilution in FA Buffer, and Nonspecific Control Serum – Absorbed, which demonstrates essentially no reactivity at a 1:5 dilution in FTA Sorbent.

Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) is lyophilized, fluorescein-conjugated (FITC) antihuman globulin containing 0.02% thimerosal as a preservative. It is used to show the presence of human syphilitic antibodies on the treponemal antigen.

Difco Tween™ 80 is Polysorbate 80, U.S.P. It is used to prepare 2% Tween 80, which acts as a dispersing agent.

Difco FA Buffer, Dried is phosphate-buffered saline (PBS) which, upon rehydration, yields a 0.85% NaCl solution buffered to pH 7.2. **Difco** FA Buffer, Dried is used in preparing:

Reactive Control Serum (4+) – Unabsorbed
Minimally Reactive Control Serum (1+)
Nonreactive Control Serum (N)
Nonspecific Staining Control – Unabsorbed

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 is standardized, reagent grade glycerin adjusted to pH 7.2 for use in mounting specimens on slides to be viewed under the fluorescence microscope.

Warnings and Precautions:

1. For *in vitro* Diagnostic Use.
2. **Difco FTA Serum Reactive**
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent Control
   WARNING! POTENTIAL BIOHAZARDOUS REAGENTS. Each donor unit used in the preparation of these reagents was tested by a FDA-licensed method for the presence of the antibody to Human Immunodeficiency Virus (HIV) as well as for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and found to be negative (were not repeatedly reactive).

   Because no test method can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus or other infectious agents are absent, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 1999.
3. **Difco FTA Antigen**
   Difco FTA Serum Reactive
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent
   Difco FTA Sorbent Control
   Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
   The Packaging of This Product Contains Dry Natural Rubber.
4. Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"[7-10] and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Storage: Store unopened products as specified below:

Difco FTA Antigen	2-8°C
Difco FTA Serum Reactive	2-8°C
Difco FTA Serum Non-Reactive	2-8°C
Difco FTA Sorbent	2-8°C
Difco FTA Sorbent Control	2-8°C
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	2-8°C in the dark
Difco Tween 80	15-30°C
Difco FA Buffer, Dried	Below 30°C
Difco FA Mounting Fluid pH 7.2	15-30°C

Rehydrated **Difco** FTA Antigen stored at 2-8°C is stable for 1 week.

Rehydrated **Difco** FA Buffer showing turbidity or mold growth should be discarded. Discard 2% Tween 80 that exhibits a precipitate or pH change.

Prolonged exposure of reagents to temperatures other than those specified is detrimental to the products.

Product Deterioration: Expiration date applies to product in its intact container when stored as directed. Do not use if the product is caked, discolored or shows other signs of deterioration.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Test serum: Collect a blood specimen by aseptic venipuncture into a clean, dry tube without anticoagulant. After the specimen has clotted, centrifuge the specimen at 1,500-2,000 rpm for 5 min to obtain test serum. Store specimens at room temperature for up to 4 h or at 2-8°C for up to 5 days; serum specimens may be frozen at or below –20°C.

Test and control sera: Equilibrate the sera to room temperature, then heat at 56°C for 30 min. Reheat previously heated sera for 10 min on the day of testing. Cool to room temperature before testing. Bacterial contamination or excessive hemolysis may render a specimen unsuitable for testing. Such specimens should not be tested.

PROCEDURE

Materials Provided
Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid, pH 7.2

Materials Required but Not Provided
Timer
Serological pipettes, 0.2 mL, 1 mL, 5 mL
Micropipettors delivering 10-200 µL
Test tubes, 12 x 75 mm
Water bath (56°C)
Vortex mixer
Platinum loop, 2 mm, 26 gauge
Slides, plain or frosted, 1 x 3 inch, 1 mm thick, inscribed with 2 x 1 cm circles
Staining dish with removable slide carriers
Slide board or holder
Moisture chamber
Acetone
Bibulous paper
Purified water
Incubator, 35-37°C
Oil, Immersion
Cover slips, No. 1, 22 mm square
Fluorescence microscope assembly:
Lamps: HBO-50, HBO-100, HBO-200 or Xenon XBO-150; 6X 5A Tungsten
Ocular: 10X
Objective: 10X, 40X (Fluorite)
Filters: BG-12 or KP490, K515 or K530
Condenser: Dark-field D1.20-1.40

Reagent Preparation

FTA Antigen: Rehydrate with 1 mL purified water and rotate to completely dissolve the contents. This solution will yield approximately 3.5 x 10^7 treponemes per mL. Mix thoroughly with a disposable pipette and rubber bulb, drawing the suspension into and expelling it from the pipette 8-10 times to break treponemal clumps and ensure an even distribution of treponemes. Confirm the even distribution by dark-field examination. Use FTA Antigen in its entirety to prepare antigen smears on the day it is rehydrated. Approximately 200-300 slides may be prepared with 1 mL of antigen.

To prepare FTA Antigen smears:
1. Wipe inscribed slides with clean gauze and, if necessary, alcohol to remove dust particles.
2. Using a platinum wire loop (2 mm, 26 gauge), smear 1 loopful of reconstituted FTA Antigen within the 2 circles. Air dry at room temperature for at least 15 min.
3. Immerse the dry slide into acetone for 10 min to fix the treponemal antigen smear to the slide; air dry. Fix no more than 50 slides per 200 mL of acetone.
4. Use slides immediately or store at or below –20°C after acetone fixation. Thaw before use; do not refreeze. Use within 1 year, but only if satisfactory results are obtained with test controls.

FTA Serum Reactive: Rehydrate with 5 mL purified water and rotate gently to completely dissolve the contents. Aliquot in 0.4 mL amounts and store at or below –20°C. Do not refreeze thawed aliquot. Approximately 12 tests may be obtained per 5 mL vial. This serum should be heated at 56°C for 30 min before use.

FTA Serum Non-Reactive: Rehydrate with 5 mL purified water and rotate gently to completely dissolve the contents. Aliquot in 0.4 mL amounts and store at or below –20°C. Approximately 90-100 tests may be obtained per 5 mL vial. This serum should be heated at 56°C for 30 min before use.

FTA Sorbent: Rehydrate with 5 mL purified water and rotate gently to completely dissolve the contents. Store at 2-8°C or aliquot and store at –20°C. The quantity of FTA Sorbent used for each test sample or serum is 0.2 mL. The quantity of FTA Sorbent needed for 3 controls is 0.6 mL. Approximately 20-25 tests may be performed with 5 mL of FTA Sorbent.

FTA Sorbent Control: Rehydrate with 0.5 mL purified water and rotate gently to completely dissolve the contents. Aliquot in 0.25 mL amounts and store at or below –20°C. For each test, 0.1 mL of FTA Sorbent Control is needed. Approximately 2 tests may be performed per 0.5 mL vial because of evaporation from heating. This serum should be heated at 56°C for 30 min before using.

FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit): Rehydrate with 1 mL or 5 mL purified water, depending on label directions. Aliquot in 0.5 mL amounts and store at or below –20°C. Each lot is supplied with a dilution titer. Since conditions and equipment differ from one laboratory to another, it is necessary to titer and test a new lot of conjugate with the fluorescence microscope assembly currently in use.[3,4,11]

1. Prepare serial dilutions in 2% Tween 80, including the titer specified on the vial.
2. Test each dilution per the Test Procedure with Reactive Control Serum (4+) and Nonspecific Staining Control.
3. Test a known lot of conjugate using the Reactive Control Serum (4+), Minimally Reactive Control Serum (1+) and Nonspecific Staining Control as controls of the reagents and test conditions.
4. The dilution to be used in the test is the dilution that produces 1 doubling dilution lower than the 4+ endpoint. The 4+ endpoint is the highest dilution of conjugate yielding 4+ fluorescence with the Reactive Control Serum (4+).

FA Buffer, Dried: Dissolve 10 g in 1 liter of purified water and rotate gently to completely dissolve the contents. Store at 2-8°C. Use the solution if it is free of mold growth and turbidity.

Tween 80: Heat the bottle of Tween 80 and a flask containing 98 mL FA Buffer to 56°C in a water bath. Add 2 mL of Tween 80 to the buffer and rinse the pipette thoroughly in the buffer. Check the pH and adjust to pH 7.2 with 1N NaOH. Discard if a precipitate develops or the pH changes.

Test Procedure

This procedure conforms to those published by the American Public Health Association.[6,11]

1. **FTA Antigen smears:** Obtain previously prepared smears, thaw and dry if appropriate, and identify the frosted end of the slides to correspond with each test and control serum to be tested.
2. Prepare the following test and control sera in appropriately identified tubes no more than 30 min before testing and mix thoroughly (at least 8 times):

   Test Serum (1:5): Dilute 0.05 mL of heated (or reheated) test serum in 0.2 mL FTA Sorbent.

   Reactive Control Serum (4+) – Unabsorbed: Dilute 0.05 mL FTA Serum Reactive in 0.2 mL FA Buffer (PBS).

   Reactive Control Serum (4+) – Absorbed: Dilute 0.05 mL FTA Serum Reactive in 0.2 mL FTA Sorbent.

   Minimally Reactive Control Serum (1+): Dilute FTA Serum Reactive, as indicated on the label, in FA Buffer (PBS) to yield a 1+ fluorescence. The minimal degree of fluorescence that can be reported as reactive is 1+ fluorescence.

   Nonreactive Control Serum (N) (1:40): Prepare a 1:40 dilution of FTA Serum Non-Reactive by adding 0.05 mL (50 µL) of serum to 1.95 mL FA Buffer (PBS).

   Nonspecific Serum Control – Unabsorbed (≥ 2+ nonspecific reactivity): Dilute 0.05 mL FTA Sorbent Control in 0.2 mL FA Buffer (PBS).

   Nonspecific Serum Control – Absorbed (nonreactive, – to ±): Dilute 0.05 mL FTA Sorbent Control in 0.2 mL FTA Sorbent.

   Nonspecific Staining Control – Unabsorbed: Use 0.03 mL FA Buffer (PBS) undiluted.

   Nonspecific Staining Control - Absorbed: Use 0.03 mL FTA Sorbent undiluted.
3. **FTA Antigen smears:** Cover the previously identified FTA Antigen smears with 0.03 mL of the corresponding test or control serum prepared above, making certain that the entire smear is covered.
4. Place the slides in a moist chamber to prevent evaporation and incubate at 35-37°C for 30 min.
5. Place the slides in a slide carrier and rinse as follows:
   • Rinse in running FA Buffer for 5 sec.
   • Soak in FA Buffer for 5 min.
   • Agitate by dipping in and out of the buffer 30 times.
   • Repeat the soaking and agitation in fresh buffer.
   • Rinse in running distilled water for 5 sec.
   • Gently blot dry with bibulous paper.
6. **FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit):** Dilute the conjugate to its working titer (determined above) using 2% Tween 80 in FA Buffer.
7. **FTA Antigen smears:** Cover each test and control smear with approximately 0.03 mL of diluted FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit). Spread uniformly to cover the entire smear.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Mount the slides immediately using a small drop of FA Mounting Fluid pH 7.2 and apply a cover slip, being careful not to trap air bubbles in the mounting fluid.
10. Immediately examine the slides microscopically for intensity of fluorescence using the microscope assembly described above. If it is necessary to delay reading, store the slides in the dark and read within 4 h. Results are valid only if the quality control pattern is satisfactory.
11. Verify the presence of treponemes on the nonreactive control slides by dark-field microscopy.

User Quality Control

Rehydrate and dilute reagents per directions above. Test as described. Tests failing to exhibit the following control results are unsatisfactory and should not be reported.[4,11]

Serum Tested	Expected Fluorescence	Interpretation
Reactive Control Serum - Unabsorbed	4+	Reactive
Reactive Control Serum - Absorbed	3+ to 4+	Reactive
Minimally Reactive Control Serum	1+	Reactive
Nonreactive Control Serum	N	Nonreactive
Nonspecific Serum Control - Unabsorbed	2+ to 4+	Reactive
Nonspecific Serum Control - Absorbed	N to ±	Nonreactive
Nonspecific Staining Control - Unabsorbed	N	Nonreactive
Nonspecific Staining Control - Absorbed	N	Nonreactive

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent NCCLS guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

RESULTS

Using the 1+ serum control as a reading standard, record the intensity of fluorescence of the treponemes and report as follows. Retest all specimens with an initial test fluorescence of 1+.

Intensity of Fluorescence	Initial Test	Retest	Report
Moderate to strong	2+ to 4+	NA	Reactive
Equivalent to 1+ control	1+	>1+	Reactive
	1+	1+	Reactive minimal*
	1+	<1+	Nonreactive
Visible staining but <1+	± to <1+	NA	Nonreactive
None or vaguely visible, not distinct	–	NA	Nonreactive
"Moth eaten" or "beaded"			Atypical†

*Equivocal result.

†Atypical or beaded pattern of fluorescence has been described in patients with lupus or other autoimmune diseases.[11]

Specimens with an initial reading of 1+ and a retest reading of 1+ or greater are reported as reactive. All other results are reported as nonreactive.

Retesting nonreactive specimens is not necessary.

Without historical or clinical evidence of treponemal infection, equivocal test results (see table) suggest the need for testing a second specimen obtained 1-2 weeks after the initial specimen.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. When the treponemal test results and the clinical opinion disagree, repeat the treponemal test and obtain additional clinical and historical information. If the disagreement persists, send the specimen to a reference laboratory, such as the local state health department, for additional confirmatory tests. The final diagnosis depends on the clinical judgment of a specialist very experienced in sexually transmitted diseases.[2,3]
2. The test should not be used to follow the response to therapy nor can it be relied on to detect new, untreated cases in epidemiological investigations.
3. "Atypical" fluorescence and false-positive results have been associated with patients having active systemic, discoid and drug-induced varieties of lupus erythematosus[12-15] and other autoimmune diseases.
4. Elderly patients may exhibit unexplained FTA-ABS reactions.
5. At times, deciding whether a reading is weak or vaguely visible may be difficult. The ability to make this distinction is critical, since a nonreactive (vaguely visible to none) serum is not retested.
6. The FTA-ABS test may be reactive in persons from areas where yaws or pinta was, or is, endemic.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS[16]

The performance of the FTA-ABS test was compared to an ELISA test, the VDRL slide test and the MHA-TP test in a study conducted by Pope, Hunter and Feeley[16] at the Centers for Disease Control in Atlanta, Georgia. Two hundred and ninety-seven (297) sera were tested by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), VDRL slide test, FTA-ABS test and the microhemagglutination assay for *T. pallidum* antibodies (MHA-TP). Table 1 below shows a comparison of test reactivity by category of disease when testing 75 sera from syphilitic individuals and 222 sera from nonsyphilitic individuals.[16]

Table 1

Category	No. Tested	No. with reactivity to: FTA-ABS	ELISA	MHA-TP	VDRL
Primary syphilis					
Untreated	22	22	17	9	17
Treated	2	2	1	2	1
Secondary syphilis					
Untreated	8	8	8	6	8
Treated	12	12	12	12	12
Latent syphilis					
Untreated	13	13	12	12	10
Treated	10	10	10	9	9
Treatment unknown	1	1	1	1	1
Questionable latent	3	3	3	3	0
Neurosyphilis	3	3	2	2	0
Cardiovascular syphilis	1	1	1	1	0
Nonsyphilis					
Presumed Normal	178	1	1	1	0
Biological false-positive	15	1	0	0	7
Diseases other than syphilis	29	1	1	0	1

Table 2 below lists the sensitivities and specificities of each method published in this study.[16]

Table 2

Test	Sensitivity	Specificity
FTA-ABS	100%	97.8%
ELISA	89.3%	98.5%
MHA-TP	76%	98.2%
VDRL	93.3%	92.7%

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
223441	**Difco™** FTA Antigen, 1 mL
224401	**Difco™** FTA Serum Non-Reactive, 5 mL
224391	**Difco™** FTA Serum Reactive, 5 mL
232591	**Difco™** FTA Sorbent, 5 mL
232592	**Difco™** FTA Sorbent, 6 x 5 mL
232661	**Difco™** FTA Sorbent Control, 6 x 0.5 mL
223143	**Difco™** FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	**Difco™** FA Buffer, Dried, 100 g
224491	**Difco™** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 1 mL
224492	**Difco™** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 5 mL
223291	**Difco™** FA Mounting Fluid pH 7.2, 6 x 5 mL
231181	**Difco™** Tween™ 80, 100 g

REFERENCES

1. Johnson, R.M. Letter. July 1, 1994. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Rockville, Md.
2. Janda, W.M. (ed.). 1994. Immunology, p. 9.7.1-9.7.20. *In* H.D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Norris, S.J., V. Pope, R.E. Johnson and S.A. Larsen. 2003. *Treponema* and other human host-associated spirochetes, p. 955-971. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Yolken (eds.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Turgeon, M.L. 1990. Immunology and serology in laboratory medicine. The C.V. Mosby Company, St. Louis, Mo.
5. Hunter, E.F., W.E. Deacon and P.E. Meyer. 1964. An improved FTA test for syphilis; the absorption procedure (FTA-ABS). Publ. Hlth. Report. *79*:410-412.
6. Wentworth, B.B., and F.N. Judson. 1984. Laboratory methods for the diagnosis of sexually transmitted diseases. American Public Health Association, Washington, D.C
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. *17*:53-80.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
11. Larsen, S.A., V. Pope, R.E. Johnson and E.J. Kennedy, Jr. (ed.). 1998. A manual of tests for syphilis, 9th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
12. Kraus, S.J., J.R. Haserick and M.A. Lantz. 1970. Fluorescent treponemal antibody absorption test reactions in lupus erythematosus. N. Engl. J. Med. *282*:1287-1290.
13 Shore, R.N., and J.A. Faricelli. 1977. Borderline and reactive FTA-ABS results in lupus erythematosus. Arch. Dermatol. *113*:37-41.
14. Monson, R.A. 1973. Biological false-positive FTA-ABS test in drug induced lupus erythematosus. J.A.M.A. *224*:1028-1030.
15. Anderson, B., and M.T. Stillman. 1978. False-positive FTA-ABS in hydralazine-induced lupus. J.A.M.A. *239*:1392-1493.
16. Pope, V, E.F. Hunter and J.C. Feeley. 1982. Evaluation of the microenzyme-linked immunosorbent assay with *Treponema pallidum* antigen. J. Clin. Microbiol. *15*:630-634.

FTA-ABS Test Procedure — **Abbreviated Schematic**

Step 1.	Step 2.	Step 3.	Step 4.	Step 5.
Prepare sera and reagents.	Dilute sera.	Add test/control serum to appropriate FTA Antigen smears.	Add conjugate to FTA Antigen smears.	Record reactions of test and control sera. Verify that the control sera provided the expected results.
FTA Antigen	**FTA Antigen Smear**			
Rehydrate with 1 mL purified water. Prepare smears. Fix with acetone. Use as "FTA Antigen smear."	Thaw, dry and identify sufficient FTA Antigen smears to correspond with each of the test and control sera to be tested.			
		Test (Patient) Serum		
Heat at 56°C for 30 min or reheat previously heated serum for 10 min.	Dilute 1:5 by adding 0.05 mL serum to 0.2 mL in FTA Sorbent.	Apply 0.03 mL test serum to an FTA Antigen smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	Dependent on antibody status or test serum.
FTA Serum Reactive		**Reactive Control Serum (4+) - Unabsorbed**		
Rehydrate with 5 mL purified water. Heat at 56°C for 30 min.	Dilute 1:5 by adding 0.05 mL FTA Serum Reactive to 0.2 mL FA Buffer.	Apply 0.03 mL Reactive Control Serum - Unabsorbed to an FTA Antigen Smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	4+ Reactive
		Reactive Control Serum (4+) - Absorbed		
	Dilute 1:5 by adding 0.05 mL FTA Serum Reactive to 0.2 mL FTA Sorbent.	Apply 0.03 mL Reactive Control Serum - Absorbed to an FTA Antigen smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	3+ to 4+ Reactive
		Minimally Reactive Control Serum (1+)		
	Dilute FTA Serum Reactive to 1+ fluorescence (labeled titer) in FA Buffer.	Apply 0.03 mL Minimally Reactive Control Serum to an FTA Antigen Smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	1+ Reactive
FTA Serum Non-Reactive		**Nonreactive Control Serum**		
Rehydrate with 5 mL purified water. Heat at 56°C for 30 min.	Dilute 1:40 by adding 0.05 mL FTA Serum Non-Reactive to 1.95 mL FA Buffer.	Apply 0.03 mL Nonreactive Control Serum to an FTA Antigen smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	N - Nonreactive
FTA Sorbent Control		**Nonspecific Serum Control - Unabsorbed**		
Rehydrate with 0.5 mL purified water. Heat at 56°C for 30 min.	Dilute 1:5 by adding 0.05 mL FTA Sorbent Control to 0.2 mL FA Buffer.	Apply 0.03 mL Nonspecific Serum Control - Unabsorbed to an FTA Antigen Smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically	2+ to 4+ Reactive
		Nonspecific Serum Control - Absorbed		
	Dilute 1:5 by adding 0.05 mL FTA Sorbent Control to 0.2 mL FTA Sorbent.	Apply 0.03 mL Nonspecific Serum Control - Absorbed to an FTA Antigen smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically	N to ± Nonreactive
FA Buffer, Dried		**Nonspecific Serum Control - Unabsorbed**		
Dissolve 10 g in 1 L purified water.	Use 0.03 mL FA Buffer undiluted as the diluent (above) and as the Nonspecific Staining Control - Unabsorbed.	Apply 0.03 mL Nonspecific Staining Control - Unabsorbed to an FTA Antigen smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	N - Nonreactive
FTA Sorbent		**Nonspecific Staining Control - Absorbed**		
Rehydrate with 5 mL purified water.	Use 0.03 mL FTA Sorbent undiluted as the diluent (above) and as the Nonspecific Staining Control - Absorbed.	Apply 0.03 mL Nonspecific Staining Control - Absorbed to an FTA Antigen smear. Incubate smear. Rinse.	Apply 0.03 mL conjugate to the smear. Incubate, rinse and mount slide. Examine microscopically.	N - Nonreactive
FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)				
Rehydrate with 1 mL or 5 mL purified water. Determine titer if a new lot.	Dilute to labeled titer with 2% Tween. Use as "Conjugate."			
Tween 80				
Heat Tween 80 and FA Buffer to 56°C. Add 2 mL Tween 80 to 98 mL FA Buffer. Adjust to pH 7.2. Use as "2% Tween."				

BD Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid pH 7,2

Français

APPLICATION

Ces réactifs sont utilisés dans le test d'immunofluorescence absorbée du tréponème FTA-ABS. Le test FTA-ABS est une méthode de détection des anticorps humains spécifiques de *Treponema pallidum*, l'agent pathogène de la syphilis, par immunofluorescence indirecte.

Les réactifs Difco FTA n'ont pas reçu l'agrément (approbation) de la FDA pour servir aux tests de dépistage sur le sang ou le plasma provenant de donneurs.[1]

RESUME ET EXPLICATION

Treponema pallidum est l'agent pathogène de la syphilis, une infection chronique présentant de nombreux signes cliniques qui évoluent en phases distinctes nécessitant chacune des analyses de laboratoire différentes.

Comme les signes cliniques de la syphilis peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies infectieuses ou d'états non infectieux à l'origine de lésions cutanées, le diagnostic doit comprendre l'examen microscopique de biopsies de lésions et les résultats des tests sérologiques.[2]

Le test FTA-ABS est un test diagnostique standard de la syphilis telle que définie par le CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Les autres tests tréponémiques standard comprennent le test d'immunofluorescence absorbée du tréponème à double marquage (FTA-ABS DS) et le test de microhémagglutination des anticorps spécifiques de *Treponema pallidum* (MHA-TP).

Les tests d'antigènes tréponémiques comme le FTA-ABS servent à confirmer le diagnostic lorsque le test initial non tréponémique est positif. Le test FTA-ABS est également utile lorsque le tableau clinique, les antécédents ou les données épidémiologiques de syphilis ne concordent pas avec les tests non tréponémiques. La positivité, parfois définitive, du test FTA-ABS dans le cas d'une syphilis traitée limite son emploi dans le cas du suivi de la réponse au traitement. Par conséquent, le test FTA-ABS n'est pas fiable non plus pour détecter les nouveaux cas non traités lors des études épidémiologiques. Le test ne doit pas servir de seule méthode de dépistage en routine.[3,4] La probabilité d'obtenir un résultat de test FTA-ABS positif aux différents stades d'une syphilis non traitée est la suivante :[2]

Stade de la syphilis non traitée	Positivité (%)
Primaire	84
Secondaire	100
Latente	100
Tertiaire (tardive)	96

PRINCIPES DE LA METHODE

Le sérum du patient est dilué au 1/5 dans un sorbant et étalé sur une lame de microscope sur laquelle *T. pallidum* a été fixé. Si le sérum du patient contient les anticorps recherchés, ceux-ci se lient aux tréponèmes fixés sur la lame. Une immunoglobuline anti-humaine marquée à la fluorescéine est ajoutée. Elle se lie aux anticorps du patient déjà liés à *T. pallidum*, et les spirochètes ainsi marqués à la fluorescéine peuvent être observés au microscope à fluorescence.[5,6]

REACTIFS

Le **Difco FTA Antigen** (également appelé antigène de *T. pallidum*) est une suspension standardisée et lyophilisée de *T. pallidum* (souche Nichols) tués.

Le **Difco FTA Serum Reactive** est un sérum humain syphilitique, standardisé et lyophilisé contenant 0,02 % de thimérosal (conservateur). Il sert à préparer :

Sérum de contrôle réactif (4+) – Non absorbé
Sérum de contrôle réactif (4+) – Absorbé
Sérum de contrôle présentant une réactivité minimale (1+)

Il sert de contrôle positif au test FTA-ABS.

Le **Difco FTA Serum Non-Reactive** est un sérum humain non syphilitique, standardisé et lyophilisé contenant 0,02 % de thimérosal (conservateur). Il sert de base au sérum de contrôle non réactif (N) et de contrôle négatif au test FTA-ABS.

Le **Difco FTA Sorbent** est un extrait standardisé et lyophilisé de tréponème non pathogène de Reiter (*Treponema phagedenis*) préparé à partir d'une culture en bouillon. Il sert à éliminer les anticorps dirigés contre les tréponèmes non pathogènes lors de la préparation de l'échantillon à tester.

Le **Difco FTA Sorbent Control** est un sérum humain non syphilitique, standardisé et lyophilisé contenant 0,02 % de thimérosal (conservateur). Il sert de base au sérum de contrôle non spécifique (non absorbé) qui, dilué au 1/5 dans du FA Buffer, présente une réactivité non spécifique supérieure ou égale à 2+, et au sérum de contrôle non spécifique (absorbé) qui, dilué au 1/5 dans du FTA Sorbent, est principalement non réactif.

Le **Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)** est une immunoglobuline anti-humaine conjuguée à la fluorescéine (FITC), sous forme lyophilisée, contenant 0,02 % de thimérosal (conservateur). Elle sert à mettre en évidence les anticorps syphilitiques humains spécifiques de l'antigène tréponémique.

Le **Difco Tween 80** est composé de polysorbate 80 de qualité USP. Il sert à préparer le Tween 80 à 2 %, qui agit comme agent dispersant.

Le **Difco FA Buffer, Dried** est composé de sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS). Après reconstitution, on obtient une solution de NaCl à 0,85 % tamponnée à pH 7,2. Le **Difco** FA Buffer, Dried sert à préparer :

Sérum de contrôle réactif (4+) – Non absorbé
Sérum de contrôle présentant une réactivité minimale (1+)
Sérum de contrôle non réactif (N)
Contrôle de marquage non spécifique – Non absorbé

Le **Difco FA Mounting Fluid, pH 7.2** est composé de glycérine standardisée de qualité « réactif », à pH 7,2, et sert à monter les échantillons sur les lames à examiner au microscope à fluorescence.

Avertissements et précautions :

1. Réservé au diagnostic *in vitro*.
2. **Difco FTA Serum Reactive**
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent Control

   AVERTISSEMENT : REACTIFS A RISQUE BIOLOGIQUE. Chaque unité de donneur utilisée pour la préparation de ces réactifs a été testée par une méthode sous licence FDA de dépistage d'anticorps spécifiques du virus d'immunodéficience humaine (VIH) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) et s'est avérée négative (n'était pas réactive à plusieurs reprises).

   Aucune méthode de test ne pouvant garantir avec certitude l'absence du VIH, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux, il convient de manipuler ces réactifs en respectant des pratiques de sécurité biologique de niveau 2, comme pour tout sérum ou échantillon sanguin humain capable de transmettre une maladie infectieuse (voir le manuel *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 1999, publié par les CDC [Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health] américains).
3. **Difco FTA Antigen**
   Difco FTA Serum Reactive
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent
   Difco FTA Sorbent Control
   Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)

   L'emballage de ce produit contient du caoutchouc naturel sec.
4. Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »[7-10] et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Conservation : Conserver les produits non entamés aux températures indiquées ci-dessous :

Difco FTA Antigen	2 à 8 °C	
Difco FTA Serum Reactive	2 à 8 °C	
Difco FTA Serum Non-Reactive	2 à 8 °C	
Difco FTA Sorbent	2 à 8 °C	
Difco FTA Sorbent Control	2 à 8 °C	
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	2 à 8 °C	dans l'obscurité
Difco Tween 80	15 à 30 °C	
Difco FA Buffer, Dried	Inférieure à 30 °C	
Difco FA Mounting Fluid, pH 7,2	15 à 30 °C	

Le **Difco** FTA Antigen reconstitué reste stable pendant 1 semaine entre 2 et 8 °C.

Jeter le **Difco** FA Buffer reconstitué si la solution est trouble ou présente des moisissures. Jeter le Tween 80 à 2 % en cas de précipité ou de modification du pH.

L'exposition prolongée des réactifs à des températures autres que les températures spécifiées a un effet adverse sur ceux-ci.

Détérioration du produit : La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions. Ne pas utiliser le produit s'il présente un aspect agglutiné ou décoloré, ou d'autres signes de détérioration.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Sérum à tester : Dans un tube propre et ne contenant pas d'anticoagulant, recueillir un échantillon sanguin par ponction veineuse en conditions aseptiques. Une fois l'échantillon coagulé, centrifuger à 1 500 à 2 000 tr/min pendant 5 min pour séparer le sérum à tester. Conserver les échantillons à température ambiante pendant 4 h maximum ou entre 2 et 8 °C jusqu'à 5 jours ; les échantillons sériques peuvent être congelés à –20 °C.

Sérums à tester et sérums de contrôle : Laisser les sérums s'équilibrer jusqu'à la température ambiante, puis les faire chauffer à 56 °C pendant 30 min. Le jour du test, réchauffer pendant 10 min les sérums déjà traités à la chaleur. Laisser refroidir jusqu'à la température ambiante avant d'effectuer le test. Une contamination bactérienne ou une hémolyse excessive risque de rendre un échantillon impropre au test. Ne pas tester un tel échantillon.

METHODE

Matériaux fournis

Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid, pH 7,2

Matériaux requis mais non fournis

Minuterie
Pipettes sérologiques, 0,2 mL, 1 mL, 5 mL
Micropipettes pouvant distribuer 10 à 200 µL
Tubes à essai, 12 x 75 mm
Bain-marie (56 °C)
Agitateur à vortex
Ensemenceur à anse de platine, 2 mm, calibre 26 G
Lames, brutes ou dépolies, 2,54 x 7,62 cm environ, épaisseur 1 mm, comportant des cercles inscrits de 2 x 1 cm
Bac à coloration équipé de porte-lames amovibles
Casier à lames ou porte-lames
Chambre humide
Acétone
Papier absorbant
Eau purifiée
Incubateur (35 à 37 °C)
Huile d'immersion
Lamelles carrées n° 1 de 22 mm de côté
Configuration du microscope à fluorescence :
Lampes : HBO-50, HBO-100, HBO-200 ou XBO-150 au xénon ; 6X 5A au tungstène
Oculaire : 10X
Objectif : 10X, 40X (fluorite)
Filtres : BG-12 ou KP490, K515 ou K530
Condensateur : D1,20-1,40 pour fond noir

Préparation des réactifs

FTA Antigen : Reconstituer avec 1 mL d'eau purifiée et agiter d'un mouvement circulaire pour dissoudre entièrement le contenu. Cette solution contient environ 3,5 x 10^7 tréponèmes/mL. A l'aide d'une poire en caoutchouc montée sur une pipette jetable, bien mélanger 8 à 10 fois de suite la suspension par aspiration/dépose afin de briser les agrégats de tréponèmes pour obtenir une distribution homogène. Contrôler l'homogénéité de la suspension par examen microscopique sur fond noir. La solution de FTA Antigen reconstituée doit être utilisée le jour même pour préparer les frottis d'antigène. 1 mL de solution d'antigène permet de préparer environ 200 à 300 lames.

Préparation des frottis de FTA Antigen :

1. Essuyer les lames comportant les cercles inscrits avec des compresses propres éventuellement imbibées d'alcool afin d'éliminer la poussière.
2. A l'aide d'un ensemenceur à anse de platine (2 mm, calibre 26 G), étaler une pleine anse de solution de FTA Antigen reconstituée au sein des 2 cercles. Sécher à l'air à température ambiante pendant 15 min.
3. Immerger la lame sèche dans l'acétone pendant 10 min pour fixer le frottis d'antigène tréponémique sur la lame ; sécher à l'air. Ne pas fixer plus de 50 lames par 200 mL d'acétone.
4. Utiliser les lames immédiatement ou les congeler à une température inférieure à –20 °C après l'étape de fixation à l'acétone. Décongeler avant l'emploi ; ne pas recongeler. Utiliser dans l'année qui suit, mais uniquement si les contrôles du test donnent des résultats satisfaisants.

FTA Serum Reactive : Reconstituer avec 5 mL d'eau purifiée et agiter doucement d'un mouvement circulaire pour dissoudre entièrement le contenu. Aliquoter en volumes de 0,4 mL et congeler à une température inférieure ou égale à –20 °C. Ne pas recongeler une aliquote décongelée. Un flacon de 5 mL permet de réaliser environ 12 tests. Faire chauffer le sérum à 56 °C pendant 30 min avant l'emploi.

FTA Serum Non-Reactive : Reconstituer avec 5 mL d'eau purifiée et agiter doucement d'un mouvement circulaire pour dissoudre entièrement le contenu. Aliquoter en volumes de 0,4 mL et congeler à une température inférieure ou égale à –20 °C. Un flacon de 5 mL permet de réaliser environ 90 à 100 tests. Faire chauffer le sérum à 56 °C pendant 30 min avant l'emploi.

FTA Sorbent : Reconstituer avec 5 mL d'eau purifiée et agiter doucement d'un mouvement circulaire pour dissoudre entièrement le contenu. Conserver entre 2 et 8 °C ou aliquoter et congeler à –20 °C. Utiliser 0,2 mL de FTA Sorbent par échantillon ou sérum à tester. Il faut 0,6 mL de FTA Sorbent pour 3 contrôles. 5 mL de FTA Sorbent permettent de réaliser environ 20 à 25 tests.

FTA Sorbent Control : Reconstituer avec 0,5 mL d'eau purifiée et agiter doucement d'un mouvement circulaire pour dissoudre entièrement le contenu. Aliquoter en volumes de 0,25 mL et congeler à une température inférieure ou égale à –20 °C. Il faut 0,1 mL de FTA Sorbent Control pour chaque test. Un flacon de 0,5 mL permet de réaliser environ 2 tests en raison de l'évaporation due au chauffage. Faire chauffer ce sérum à 56 °C pendant 30 min avant l'emploi.

FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) : Reconstituer avec 1 mL ou 5 mL d'eau purifiée, suivant les instructions figurant sur l'étiquette. Aliquoter en volumes de 0,5 mL et congeler à une température inférieure ou égale à –20 °C. Le titre de dilution est indiqué sur chaque lot. Comme les conditions de test et le matériel utilisé diffèrent d'un laboratoire à l'autre, il est nécessaire de titrer et de tester un nouveau lot de conjugué avec le microscope à fluorescence dans sa configuration actuelle.[3,4,11]

1. Préparer des dilutions sériées dans du Tween 80 à 2 %, en y incluant le titre indiqué sur le flacon.
2. Tester chaque dilution en suivant le mode opératoire du test avec le sérum de contrôle réactif (4+) et le contrôle de marquage non spécifique.
3. A titre de contrôles des réactifs et des conditions de test, tester un lot connu de conjugué avec le sérum de contrôle réactif (4+), le sérum de contrôle présentant une réactivité minimale (1+) et le contrôle de marquage non spécifique.
4. La dilution à utiliser pour le test correspond au double de la dilution du point de fin de titrage du contrôle 4+. Le point de fin de titrage du contrôle 4+ correspond à la dilution la plus élevée du conjugué produisant une fluorescence d'intensité 4+ avec le sérum de contrôle réactif (4+).

FA Buffer, Dried : Dissoudre 10 g dans 1 L d'eau purifiée et agiter doucement d'un mouvement circulaire pour dissoudre entièrement le contenu. Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser la solution si elle est trouble ou présente des moisissures.

Tween 80 : Faire chauffer le flacon de Tween 80 et une fiole contenant 98 mL de FA Buffer au bain-marie à 56 °C. Ajouter 2 mL de Tween 80 au tampon et rincer soigneusement la pipette avec le tampon. Mesurer le pH et l'ajuster à 7,2 avec de la soude 1 N. Jeter le réactif si un précipité apparaît ou si le pH se modifie.

Mode opératoire du test

Cette méthode est conforme à celles publiées par l'American Public Health Association.[6,11]

1. **Frottis de FTA Antigen :** Décongeler des frottis précédemment préparés, les sécher le cas échéant, puis identifier les extrémités dépolies des lames pour les faire correspondre aux sérums de contrôle et aux sérums à tester.
2. Préparer les sérums de contrôle et les sérums à tester dans des tubes convenablement étiquetés moins de 30 min avant le test et bien mélanger (8 fois au moins) :

   Sérum à tester (1/5) : Diluer 0,05 mL de sérum à tester chauffé (ou réchauffé) dans 0,2 mL de FTA Sorbent.

   Sérum de contrôle réactif (4+) – Non absorbé : Diluer 0,05 mL de FTA Serum Reactive dans 0,2 mL de FA Buffer (PBS).

   Sérum de contrôle réactif (4+) – Absorbé : Diluer 0,05 mL de FTA Serum Reactive dans 0,2 mL de FTA Sorbent.

   Sérum de contrôle présentant une réactivité minimale (1+) : Diluer du FTA Serum Reactive, comme indiqué sur l'étiquette, dans du FA Buffer (PBS) afin d'obtenir une fluorescence d'intensité 1+. Le degré minimal de fluorescence pouvant être interprétée comme positive définit la fluorescence d'intensité 1+.

   Sérum de contrôle non réactif (N) (1/40) : Préparer une dilution au 1/40 de FTA Serum Non-Reactive en ajoutant 0,05 mL (50 µL) de sérum à 1,95 mL de FA Buffer (PBS).

   Contrôle sérique non spécifique – Non absorbé (réactivité non spécifique ≥ 2+) : Diluer 0,05 mL de FTA Sorbent Control dans 0,2 mL de FA Buffer (PBS).

   Contrôle sérique non spécifique – Absorbé (non réactif, – à ±) : Diluer 0,05 mL de FTA Sorbent Control dans 0,2 mL de FTA Sorbent.

   Contrôle de marquage non spécifique – Non absorbé : Utiliser 0,03 mL de FA Buffer (PBS) non dilué.

   Contrôle de marquage non spécifique – Absorbé : Utiliser 0,03 mL de FTA Sorbent non dilué.
3. **Frottis de FTA Antigen :** Couvrir les frottis de FTA Antigen avec 0,03 mL du sérum à tester ou du sérum de contrôle correspondant préparé ci-dessus, en veillant à recouvrir la totalité du frottis.
4. Placer les lames en chambre humide pour éviter l'évaporation et les incuber entre 35 et 37 °C pendant 30 min.
5. Placer les lames dans un porte-lames et les rincer comme suit :
   - Rincer sous du FA Buffer pendant 5 sec.
   - Tremper dans du FA Buffer pendant 5 min.
   - Agiter en trempant la lame dans le tampon puis en la ressortant, à 30 reprises.
   - Renouveler l'opération de trempage et d'agitation dans du tampon frais.
   - Rincer sous l'eau distillée pendant 5 sec.
   - Sécher délicatement sur du papier absorbant.
6. **FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) :** Diluer le conjugué à son titre de travail (déterminé ci-dessus) avec du Tween 80 à 2 % dans du FA Buffer.
7. **Frottis de FTA Antigen :** Couvrir chaque frottis à tester et frottis de contrôle avec environ 0,03 mL de FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) diluée. Etaler uniformément pour couvrir en totalité le frottis.
8. Répéter les étapes 4 à 5.
9. Monter les lames immédiatement à l'aide d'une petite goutte de FA Mounting Fluid pH 7,2 et apposer une lamelle en veillant à ne pas emprisonner de bulles d'air dans le liquide de montage.
10. Examiner immédiatement les lames au microscope à fluorescence dans la configuration décrite plus haut afin d'évaluer l'intensité de la fluorescence. Si la lecture des lames doit intervenir plus tard, conserver les lames dans l'obscurité et les examiner dans les 4 h. Les résultats ne peuvent être validés que si le contrôle de qualité est satisfaisant.
11. Vérifier la présence des tréponèmes sur les lames de contrôle non réactives par examen microscopique sur fond noir.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Reconstituer et diluer les réactifs comme indiqué plus haut. Réaliser le test comme indiqué. Les tests dont les contrôles ne donnent pas les résultats escomptés ne doivent pas être pris en considération.[4,11]

Sérum testé	Fluorescence attendue	Interprétation
Sérum de contrôle réactif - Non absorbé	4+	Réactif
Sérum de contrôle réactif - Absorbé	3+ à 4+	Réactif
Sérum de contrôle présentant une réactivité minimale	1+	Réactif
Sérum de contrôle non réactif	N	Non réactif
Contrôle sérique non spécifique - Non absorbé	2+ à 4+	Réactif
Contrôle sérique non spécifique - Absorbé	N à ±	Non réactif
Contrôle de marquage non spécifique - Non absorbé	N	Non réactif
Contrôle de marquage non spécifique - Absorbé	N	Non réactif

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives NCCLS et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

En utilisant le contrôle sérique 1+ comme standard de lecture, observer l'intensité de fluorescence des tréponèmes et rapporter les résultats comme suit. Tester à nouveau tous les échantillons dont la fluorescence initiale est d'intensité 1+.

Intensité de fluorescence	Test initial	Nouveau test	Rapport
Modérée à forte	2+ à 4+	SO	Réactif
Equivalente au contrôle 1+	1+	>1+	Réactif
	1+	1+	Réactivité minimale*
	1+	<1+	Non réactif
Marquage visible mais d'intensité <1+	± à <1+	SO	Non réactif
Absente ou vaguement visible ; non distincte	–	SO	Non réactif
« Mouchetée » ou « perlée »			Atypique†

*Résultat incertain.

†Des caractéristiques de fluorescence atypique ou perlée ont été décrites chez les patients atteints de lupus ou d'autres maladies auto-immunes.[11]

Les échantillons dont la fluorescence initiale est d'intensité 1+, puis 1+ ou supérieure après un nouveau test sont rapportés comme positifs. Tous les autres résultats sont rapportés comme non positifs.

Il n'est pas nécessaire de tester de nouveau les échantillons non positifs.

En l'absence d'antécédents ou de signe clinique d'infection à tréponèmes, des résultats de tests incertains (voir tableau) laissent à penser qu'il est nécessaire de tester un second échantillon obtenu une à deux semaines après le prélèvement initial.

LIMITES DE LA PROCEDURE

1. Lorsque les résultats du test tréponémique et l'évaluation clinique sont contradictoires, répéter le test tréponémique et solliciter un complément d'information sur le tableau clinique et les antécédents du patient. Si le désaccord persiste, adresser l'échantillon à un laboratoire de référence national pour faire réaliser des tests de confirmation complémentaires. Le diagnostic définitif doit être porté par un clinicien expert en maladies sexuellement transmissibles.[2,3]
2. Le test ne doit pas être utilisé pour suivre la réponse au traitement ni pour détecter les nouveaux cas non traités lors d'études épidémiologiques.
3. Des caractéristiques de fluorescence « atypiques » et des faux positifs ont été décrits chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique, chronique (discoïde) ou d'origine médicamenteuse[12-15] ou d'autres maladies auto-immunes.
4. Les échantillons provenant de personnes âgées peuvent produire des réactions inexpliquées avec le test FTA-ABS.
5. Il est parfois difficile de qualifier une fluorescence de faible ou vaguement visible. La capacité à opérer cette distinction est essentielle, car un sérum non réactif (fluorescence vague ou absente) n'est pas testé une nouvelle fois.
6. Le test FTA-ABS peut être sensible chez les personnes vivant dans des zones où le pian ou le caraté sont (ou ont été) endémiques.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES[16]

Les performances du test FTA-ABS ont été comparées à celles d'un test ELISA, du test VDRL sur lame et du test MHA-TP dans une étude menée par Pope, Hunter et Feeley[16] au centre épidémiologique d'Atlanta aux Etats-Unis. 297 sérums ont été testés par méthode immunoenzymatique ELISA, test VDRL sur lame, test FTA-ABS et test de micro-hémagglutination des anticorps spécifiques de *T. pallidum* (MHA-TP). Le tableau 1 ci-dessous récapitule les résultats d'une étude de comparaison de la sensibilité des tests par classe d'affection à partir des résultats obtenus sur 75 sérums syphilitiques et 222 sérums non syphilitiques.[16]

Tableau 1

Classe	Nb. d'échantillons testés	Nb. d'échantillons réactifs à : FTA-ABS	ELISA	MHA-TP	VDRL
Syphilis primaire					
Non traitée	22	22	17	9	17
Traitée	2	2	1	2	1
Syphilis secondaire					
Non traitée	8	8	8	6	8
Traitée	12	12	12	12	12
Syphilis latente					
Non traitée	13	13	12	12	10
Traitée	10	10	10	9	9
Statut du traitement inconnu	1	1	1	1	1
Latente incertaine	3	3	3	3	0
Neurosyphilis	3	3	2	2	0
Syphilis cardiovasculaire	1	1	1	1	0
Non syphilitique					
Présumé sain	178	1	1	1	0
Faux positif biologique	15	1	0	0	7
Affections autres que la syphilis	29	1	1	0	1

Le tableau 2 ci-dessous récapitule les sensibilités et spécificités de chacune des méthodes publiées dans cette étude.[16]

Tableau 2

Test	Sensibilité	Spécificité
FTA-ABS	100%	97,8%
ELISA	89,3%	98,5%
MHA-TP	76%	98,2%
VDRL	93,3%	92,7%

CONDITIONNEMENT

No réf.	Description
223441	**Difco** FTA Antigen, 1 mL
224401	**Difco** FTA Serum Non-Reactive, 5 mL
224391	**Difco** FTA Serum Reactive, 5 mL
232591	**Difco** FTA Sorbent, 5 mL
232592	**Difco** FTA Sorbent, 6 x 5 mL
232661	**Difco** FTA Sorbent Control, 6 x 0.5 mL
223143	**Difco** FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	**Difco** FA Buffer, Dried, 100 g
224491	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 1 mL
224492	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 5 mL
223291	**Difco** FA Mounting Fluid pH 7,2, 6 x 5 mL
231181	**Difco** Tween 80, 100 g

REFERENCES : voir la rubrique « References » du texte anglais.

Mode opératoire du test FTA-ABS **Schéma abrégé**

Etape 1.	Etape 2.	Etape 3.	Etape 4.	Etape 5.
Préparer les sérums et les réactifs.	Diluer les serums.	Ajouter le sérum à tester/sérum de contrôle aux frottis de FTA Antigen correspondants.	Ajouter le conjugué aux frottis de FTA Antigen.	Observer les réactions obtenues avec les sérums à tester et les sérums de contrôle. S'assurer que les sérums de contrôle donnent les résultats attendus.

FTA Antigen	Frottis de FTA Antigen
Reconstituer avec 1 mL d'eau purifiée. Préparer des frottis. Fixer à l'acétone. Utiliser comme « frottis de FTA Antigen ».	Décongeler et sécher un nombre suffisant de frottis de FTA Antigen, puis les identifier pour les faire correspondre aux sérums de contrôle et aux sérums à tester.

Sérum à tester (clinique)				
Faire chauffer à 56 °C pendant 30 min ou réchauffer pendant 10 min un sérum déjà traité à la chaleur.	Diluer au 1/5 en ajoutant 0,05 mL de sérum à 0,2 mL de FTA Sorbent.	Déposer 0,03 mL de sérum à tester sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	Fonction de la présence ou de l'absence d'anticorps, ou du sérum à tester.
FTA Serum Reactive	**Sérum de contrôle réactif (4+) – Non absorbé**			
Reconstituer avec 5 mL d'eau purifiée. Faire chauffer à 56 °C pendant 30 min.	Diluer au 1/5 en ajoutant 0,05 mL de FTA Serum Reactive à 0,2 mL de FA Buffer.	Déposer 0,03 mL de sérum de contrôle réactif (non absorbé) sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	Réactif, 4+
	Sérum de contrôle réactif (4+) – Absorbé			
	Diluer au 1/5 en ajoutant 0,05 mL de FTA Serum Reactive à 0,2 mL de FTA Sorbent.	Déposer 0,03 mL de sérum de contrôle réactif (absorbé) sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	Réactif, 3+ à 4+
	Sérum de contrôle présentant une réactivité minimale (1+)			
	Diluer du FTA Serum Reactive avec du FA Buffer afin d'obtenir une fluorescence d'intensité 1+ (titre indiqué sur l'étiquette).	Déposer 0,03 mL de sérum de contrôle présentant une réactivité minimale sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	Réactif, 1+
FTA Serum Non-Reactive	**Sérum de contrôle non réactif**			
Reconstituer avec 5 mL d'eau purifiée. Faire chauffer à 56 °C pendant 30 min.	Diluer au 1/40 en ajoutant 0,05 mL de FTA Serum Non-Reactive à 1,95 mL de FA Buffer.	Déposer 0,03 mL de sérum de contrôle non réactif sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	N – Non réactif
FTA Sorbent Control	**Contrôle sérique non spécifique – Non absorbé**			
Reconstituer avec 0,5 mL d'eau purifiée. Faire chauffer à 56 °C pendant 30 min.	Diluer au 1/5 en ajoutant 0,05 mL de FTA Sorbent Control à 0,2 mL de FA Sorbent.	Déposer 0,03 mL de contrôle sérique non spécifique (non absorbé) sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	Réactif, 2+ à 4+
	Contrôle sérique non spécifique – Absorbé			
	Diluer au 1/5 en ajoutant 0,05 mL de FTA Sorbent Control à 0,2 mL de FA Sorbent.	Déposer 0,03 mL de contrôle sérique non spécifique (absorbé) sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	N à ± non réactif
FA Buffer, Dried	**Contrôle sérique non spécifique – Non absorbé**			
Dissoudre 10 g dans 1 L d'eau purifiée.	Utiliser 0,03 mL de FA Buffer non dilué comme diluant (ci-dessus) et contrôle de marquage non spécifique (non absorbé).	Déposer 0,03 mL de contrôle de marquage non spécifique (non absorbé) sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	N – Non réactif
FTA Sorbent	**Contrôle de marquage non spécifique – Absorbé**			
Reconstituer avec 5 mL d'eau purifiée.	Utiliser 0,03 mL de FTA Sorbent non dilué comme diluant (ci-dessus) et contrôle de marquage non spécifique (absorbé).	Déposer 0,03 mL de contrôle de marquage non spécifique (absorbé) sur un frottis de FTA Antigen. Incuber le frottis. Rincer.	Déposer 0,03 mL de conjugué sur le frottis. Incuber, rincer et monter la lame. Examiner au microscope.	N – Non réactif
FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)				
Reconstituer avec 1 mL ou 5 mL d'eau purifiée. Déterminer le titre s'il s'agit d'un nouveau lot.	Diluer au titre indiqué sur l'étiquette avec du Tween à 2 %. Utiliser comme « conjugué ».			
Tween 80				
Faire chauffer le Tween 80 et le FA Buffer à 56 °C. Ajouter 2 mL de Tween 80 à 98 mL de FA Buffer. Ajuster à pH 7,2. Utiliser comme « Tween à 2 % ».				

BD Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid pH 7.2

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Diese Reagenzien finden Anwendung beim FTA-ABS-Test (Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptionstest). Der FTA-ABS-Test ist eine indirekte Fluoreszenz-Antikörpermethode zum Nachweis von Human-Antikörpern gegen *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis.

Die Difco FTA-Reagenzien besitzen keine FDA-Zulassung (Genehmigung) für das Testen (d.h. das Screening) von Blut- oder Plasmaspendern.[1]

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Treponema pallidum ist der Erreger der Syphilis, einer chronischen Infektionskrankheit mit zahlreichen klinischen Manifestationen. Diese Manifestationen treten in verschiedenen Stadien auf, und für den Nachweis in den einzelnen Stadien sind unterschiedliche Labortests erforderlich.

Da die klinischen Manifestationen von Syphilis mit denen anderer Infektionskrankheiten oder Hautläsionen verursachender nicht-infektiöser Zustände verwechselt werden können, muss sich eine einwandfreie Diagnose auf die mikroskopische Untersuchung von Läsionsmaterial sowie auf die Ergebnisse von serologischen Tests stützen.[2]

Der FTA-ABS-Test ist ein Standard-Diagnostiktest für Syphilis gemäß den Definitionen des US-amerikanischen Seuchenschutzamts CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Weitere Standard-Tests auf Treponemen umfassen den Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorption-Doppelfärbungstest (FTA-ABS DS) und den Mikrohämagglutinationsassay auf Antikörper gegen *Treponema pallidum* (MHA-TP).

Treponema-Antigentests, wie der FTA-ABS-Test, werden als Bestätigungstests für Diagnostikfälle herangezogen, bei denen der anfängliche Nicht-Treponema-Test reaktiv ausfällt. Außerdem ist der FTA-ABS-Test von Nutzen bei Patienten, deren klinische, Anamnese- bzw. epidemiologische Syphilisindizien nicht mit Nicht-Treponema-Tests übereinstimmen. Die fortgesetzte (mitunter lebenslange) Reaktivität des FTA-ABS-Tests bei behandelten Syphilis-Fällen minimiert dessen Nutzbarkeit für die Verlaufskontrolle des Therapieerfolgs. Daher ist der FTA-ABS-Test auch unzuverlässig im Hinblick auf die Erkennung neuer unbehandelter Fälle im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen. Der Test sollte nicht als routinemäßige Screening-Methode herangezogen werden.[3,4] Die Wahrscheinlichkeit eines reaktiven FTA-ABS-Testergebnisses in verschiedenen Stadien einer unbehandelten Syphilis wird folgendermaßen angegeben:[2]

Stadium der unbehandelten Syphilis	Reaktiv (%)
Primärstadium	84
Sekundärstadium	100
Latenzphase	100
Tertiärstadium (Spätsyphilis)	96

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Patientenserum wird im Verhältnis 1:5 in Sorbent verdünnt und in Schichten auf einen mikroskopischen Objektträger mit fixiertem *T. pallidum* aufgebracht. Wenn das Patientenserum Antikörper enthält, überziehen diese Antikörper die Treponemen auf dem Objektträger. Es wird mit Fluorescein markiertes Anti-Human-Immunglobulin hinzugegeben. Dieses verbindet sich mit den bereits am *T. pallidum* angelagerten Patienten-Antikörpern unter Bildung von fluorescein-markierten Spirochäten, die mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können.[5,6]

REAGENZIEN

Difco FTA Antigen (auch als *T. pallidum*-Antigen bezeichnet) besteht aus einer lyophilisierten, standardisierten, inaktivierten *T. pallidum*-Suspension (Nichols-Stamm).

Difco FTA Serum Reactive (**Difco**-FTA-Serum, reaktiv) besteht aus lyophilisierten, standardisierten syphilitischen Humanseren mit 0,02 % Thimerosal als Konservierungsmittel und dient zur Herstellung von:

reaktivem Kontrollserum (4+) – nicht absorbiert
reaktivem Kontrollserum (4+) – absorbiert
minimal reaktivem Kontrollserum (1+).

Dieses Reagenz dient außerdem als positive Kontrolle für den FTA-ABS-Test.

Difco FTA Serum Non-Reactive (**Difco**-FTA-Serum, nicht reaktiv) besteht aus lyophilisierten, standardisierten nicht syphilitischen Humanseren mit 0,02 % Thimerosal als Konservierungsmittel und dient zur Herstellung von nicht-reaktivem Kontrollserum (**N**). Dieses Reagenz dient als negative Kontrolle für den FTA-ABS-Test.

Difco FTA Sorbent (**Difco**-FTA-Sorbens) besteht aus einem lyophilisierten, standardisierten Extrakt apathogener Reiter-Treponemen *(Treponema phagedenis)* aus Bouillonkultur. Dieses Reagenz dient bei der Vorbereitung der Testproben zur Entfernung von Antikörpern gegen apathogene Treponemen.

Difco FTA Sorbent Control (**Difco**-FTA-Sorbens-Kontrolle) besteht aus lyophilisierten, standardisierten nicht syphilitischen Humanseren mit 0,02 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Dieses Reagenz dient zur Herstellung von unspezifischem Kontrollserum – nicht absorbiert, das bei 1:5-Verdünnung mit FA Buffer eine unspezifische Reaktivität von mindestens 2+ zeigt, sowie zur Herstellung von unspezifischem Kontrollserum – absorbiert, das bei 1:5-Verdünnung mit FTA Sorbent so gut wie keine Reaktivität zeigt.

Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) (**Difco**-FA-Human-Globulin-Antiglobulin [Kaninchen]) besteht aus lyophilisiertem, fluorescein-konjugiertem (FITC) Anti-Human-Globulin mit 0,02 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Dieses Reagenz dient zum Nachweis des Vorliegens von syphilitischen Human-Antikörpern am Treponema-Antigen.

Difco Tween 80 besteht aus Polysorbat 80 (US-Arzneibuch USP) und dient zur Herstellung von 2%igem Tween 80 mit Dispergenswirkung.

Difco FA Buffer, Dried (**Difco** FA-Puffer, getrocknet) besteht aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die nach Rehydrierung eine auf einen pH-Wert von 7,2 gepufferte 0,85%ige NaCl-Lösung ergibt. **Difco** FA Buffer, Dried dient zur Herstellung von:

reaktivem Kontrollserum (4+) – nicht absorbiert
minimal reaktivem Kontrollserum (1+)
nicht reaktivem Kontrollserum (N)
unspezifischer Färbungskontrolle – nicht absorbiert.

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 (**Difco**-FA-Fixierungsflüssigkeit; pH 7,2) besteht aus standardisiertem, analysenreinem, auf einen pH-Wert von 7,2 eingestelltem Glyzerin und dient zur Fixierung von Proben auf Objektträgern für die Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

1. *In-vitro*-Diagnostikum.
2. **Difco FTA Serum Reactive**
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent Control

   WARNUNG! POTENZIELL BIOGEFÄHRLICHE REAGENZIEN. Alle für die Herstellung dieser Reagenzien herangezogenen Spendereinheiten wurden mit einer von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) zugelassenen Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen das HI-Virus (HIV) und Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) getestet und als negativ (nicht wiederholt reaktiv) befunden.

   Da keine Testmethode das Vorliegen von HIV, Hepatitis-B-Virus oder anderer infektiöser Substanzen vollständig ausschließen kann, sind diese Reagenzien gemäß den Auflagen der Biosicherheitsstufe 2 (Biosafety Level 2) zu handhaben, wie sie in der folgenden Veröffentlichung der US-amerikanischen Gesundheitsbehörden für alle potenziell infektiösen Humanseren oder -blutproben empfohlen werden: Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 1999.
3. **Difco FTA Antigen**
   Difco FTA Serum Reactive
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent
   Difco FTA Sorbent Control
   Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)

   Die Verpackung dieses Produkts enthält Naturkautschuk (getrocknet).
4. Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“[7-10] sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Aufbewahrung: Die Produkte bis zum Öffnen unter folgenden Bedingungen lagern:

Difco FTA Antigen	2 – 8 °C
Difco FTA Serum Reactive	2 – 8 °C
Difco FTA Serum Non-Reactive	2 – 8 °C
Difco FTA Sorbent	2 – 8 °C
Difco FTA Sorbent Control	2 – 8 °C
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	2 – 8 °C , im Dunkeln
Difco Tween 80	15 – 30 °C
Difco FA Buffer, Dried	bei weniger als 30 °C
Difco FA Mounting Fluid pH 7.2	15 – 30 °C

Bei 2 – 8 °C gelagertes rehydriertes **Difco** FTA Antigen bleibt 1 Woche lang stabil.

Rehydrierter **Difco** FA Buffer mit Anzeichen von Trübung oder Schimmelwachstum ist zu entsorgen. Ausfällungen oder pH-Wertänderungen aufweisendes 2%iges Tween 80 entsorgen.

Werden die Reagenzien längere Zeit anderen Temperaturen ausgesetzt als vorgeschrieben, ist dies den Produkten abträglich.

Haltbarkeit des Produkts: Das Verfallsdatum gilt für das im unversehrten Behälter aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften. Zusammenklebendes, verfärbtes oder sonstige Verfallsanzeichen aufweisendes Produkt nicht verwenden.

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Testserum: Eine Blutprobe mit aseptischer Venenpunktionstechnik in ein sauberes, trockenes Röhrchen ohne Antikoagulans entnehmen. Die Probe nach ihrer Gerinnung 5 min lang bei 1500 – 2000 U/min zentrifugieren, um das Testserum zu gewinnen. Die Proben können bei Raumtemperatur bis zu 4 h lang gelagert werden bzw. bei 2 – 8 °C bis zu 5 Tage lang; Serumproben können bei –20 °C oder tieferen Temperaturen eingefroren werden.

Test- und Kontrollseren: Die Seren auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und anschließend 30 min lang bei 56 °C erwärmen. Bereits zuvor erwärmte Seren am Tag der Testdurchführung 10 min lang aufwärmen. Vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur abkühlen. Bakterielle Kontamination oder übermäßig starke Hämolyse können Proben für den Test ungeeignet machen. Derartige Proben nicht testen.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid, pH 7.2

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zeitgeber
Serologiepipetten (0,2 mL; 1 mL; 5 mL)
Mikropipetten mit Dispensiervolumen von 10 – 200 µL
Teströhrchen (12 x 75 mm)
Wasserbad (56 °C)
Vortexmischer
Platinöse (2 mm, 26 G)
Objektträger (normal oder matt; 2,54 x 7,62 cm; 1 mm dick; mit Kreisen von 2 x 1 cm)
Färbungsschale mit entfernbaren Objektträger-Haltern
Objektträger-Leiste oder -Halter
Feuchtigkeitskammer
Aceton
Saugfähiges Papier
Destilliertes Wasser
Inkubator (35 – 37 °C)
Immersionsöl
Deckplättchen (Nr. 1; 22 x 22 mm)
Fluoreszenzmikroskop-Konfiguration:
Lampen: HBO-50, HBO-100, HBO-200 oder Xenon XBO-150; 6X 5A Wolfram
Okular: 10X
Objektiv: 10X, 40X (Fluorit)
Filter: BG-12 oder KP490, K515 oder K530
Kondensor: Dunkelfeld D1,20 – 1,40

Vorbereitung der Reagenzien

FTA Antigen: Mit 1 mL destilliertem Wasser rehydrieren und bis zur vollständigen Lösung des Inhalts rotieren. Diese Lösung ergibt ca. 3,5 x 10^7 Treponemen pro mL. Mit Hilfe einer Einweg-Pipette und einem Gummibulbus gründlich mischen; dazu die Suspension 8 – 10 Mal in die Pipette aspirieren und wieder ausstoßen, um Treponemen-Klümpchen aufzulösen und eine gleichmäßige Verteilung der Treponemen zu gewährleisten. Die gleichmäßige Verteilung durch Dunkelfeld-Untersuchung bestätigen. Das FTA Antigen noch am Tag der Rehydrierung zur Herstellung von Antigen-Ausstrichen verwenden und vollständig aufbrauchen. Mit 1 mL Antigen können ca. 200 – 300 Objektträger präpariert werden.

Herstellen von FTA Antigen-Ausstrichen:

1. Mit Kreisen versehene Objektträger mit sauberer Gaze und erforderlichenfalls Alkohol abwischen, um Staubpartikel zu entfernen.
2. Mit Hilfe einer Platindrahtöse (2 mm, 26 G) 1 Öse voll rekonstituiertes FTA Antigen innerhalb der 2 Kreise ausstreichen. Bei Raumtemperatur mindestens 15 min lang lufttrocknen lassen.
3. Den trockenen Objektträger 10 min lang vollständig in Aceton eintauchen, um den Treponema-Antigen-Ausstrich auf dem Objektträger zu fixieren; an der Luft trocknen lassen. Mit jeweils 200 mL Aceton maximal 50 Objektträger fixieren.
4. Die Objektträger nach der Fixierung mit Aceton unverzüglich verwenden oder bei –20 °C aufbewahren. Vor Gebrauch auftauen. Nicht erneut einfrieren. Innerhalb von 1 Jahr verwenden, jedoch nur, wenn die Testkontrollen zufrieden stellende Ergebnisse erbringen.

FTA Serum Reactive: Mit 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren und bis zur vollständigen Lösung des Inhalts behutsam rotieren. Teilmengen von 0,4 mL herstellen und bei –20 °C oder tieferen Temperaturen lagern. Aufgetaute Teilmengen nicht erneut einfrieren. Ein 5-mL-Fläschchen ist ausreichend für ca. 12 Tests. Dieses Serum vor Gebrauch 30 min lang bei 56 °C erwärmen.

FTA Serum Non-Reactive: Mit 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren und bis zur vollständigen Lösung des Inhalts behutsam rotieren. Teilmengen von 0,4 mL herstellen und bei –20 °C oder tieferen Temperaturen lagern. Ein 5-mL-Fläschchen ist ausreichend für ca. 90 – 100 Tests. Dieses Serum vor Gebrauch 30 min lang bei 56 °C erwärmen.

FTA Sorbent: Mit 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren und bis zur vollständigen Lösung des Inhalts behutsam rotieren. Bei 2 – 8 °C lagern oder Teilmengen herstellen und bei –20 °C lagern. Die für jede Testprobe bzw. jedes Testserum benötigte Menge FTA Sorbent beträgt 0,2 mL. Die für 3 Kontrollen benötigte Menge FTA Sorbent beträgt 0,6 mL. Mit 5 mL FTA Sorbent können ca. 20 – 25 Tests durchgeführt werden.

FTA Sorbent Control: Mit 0,5 mL destilliertem Wasser rehydrieren und bis zur vollständigen Lösung des Inhalts behutsam rotieren. Teilmengen von 0,25 mL herstellen und bei –20 °C oder tieferen Temperaturen lagern. Für jeden Test sind 0,1 mL FTA Sorbent Control erforderlich. Auf Grund der Verdunstung während der Erwärmung ist ein 0,5-mL-Fläschchen ausreichend für ca. 2 Tests. Dieses Serum vor Gebrauch 30 min lang bei 56 °C erwärmen.

FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit): Je nach Kennzeichnungsanweisungen mit 1 mL oder 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren. Teilmengen von 0,5 mL herstellen und bei –20 °C oder tieferen Temperaturen lagern. Im Lieferumfang jeder Charge ist ein Verdünnungstiter enthalten. Da die Bedingungen und Gerätschaften von Labor zu Labor verschieden sind, müssen neue Konjugatchargen im Hinblick auf die aktuell verwendete Fluoreszenzmikroskop-Konfiguration titriert und getestet werden.[3,4,11]

1. Serienverdünnungen in 2%igem Tween 80 herstellen, einschließlich des auf dem Fläschchen angegebenen Titers.
2. Jede Verdünnung gemäß dem „Testverfahren“ mit reaktivem Kontrollserum (4+) und unspezifischer Färbungskontrolle testen.
3. Zur Überwachung von Reagenzien und Testbedingungen eine bekannte Konjugatcharge unter Verwendung von reaktivem Kontrollserum (4+), minimal reaktivem Kontrollserum (1+) und unspezifischer Färbungskontrolle testen.
4. Die für den Test heranzuziehende Verdünnung ist diejenige, die 1 Doppelverdünnung unterhalb des Endtiters von 4+ ergibt. Der Endtiter 4+ ist die höchste Verdünnung des Konjugats, die mit dem reaktiven Kontrollserum (4+) eine Fluoreszenz von 4+ ergibt.

FA Buffer, Dried: In 1 Liter destilliertem Wasser 10 g auflösen und zur vollständigen Lösung des Inhalts behutsam rotieren. Bei 2 – 8 °C lagern. Die Lösung verwenden, sofern sie kein Schimmelwachstum und keine Trübung aufweist.

Tween 80: Die Flasche mit Tween 80 sowie einen Kolben mit 98 mL FA Buffer im Wasserbad auf 56 °C erwärmen. Zum Puffer 2 mL Tween 80 hinzugeben, und die Pipette gründlich im Puffer abspülen. Den pH-Wert prüfen und mit 1N NaOH auf 7,2 einstellen. Entsorgen, falls sich Ausfällungen bilden oder pH-Wertänderungen auftreten.

Testverfahren

Dieses Verfahren entspricht den vom US-amerikanischen Volksgesundheitsverband American Public Health Association veröffentlichten Verfahren.[6,11]

1. **FTA Antigen-Ausstriche:** Bereits zuvor angefertigte Ausstriche zur Hand nehmen, ggf. auftauen und trocknen, und die matten Enden der Objektträger für die einzelnen zu testenden Test- und Kontrollseren kennzeichnen.
2. Maximal 30 min vor Testbeginn die folgenden Test- und Kontrollseren in entsprechend gekennzeichneten Röhrchen vorbereiten und gründlich mischen (mindestens 8 Mal):

   Testserum (1:5): In 0,2 mL FTA Sorbent 0,05 mL erwärmtes (oder aufgewärmtes) Testserum auflösen.

   Reaktives Kontrollserum (4+) – nicht absorbiert: In 0,2 mL FA Buffer (PBS) 0,05 mL FTA Serum Reactive auflösen.

   Reaktives Kontrollserum (4+) – absorbiert: In 0,2 mL FTA Sorbent 0,05 mL FTA Serum Reactive auflösen.

   Minimal reaktives Kontrollserum (1+): FTA Serum Reactive gemäß den Kennzeichnungsangaben in FA Buffer (PBS) auflösen, so dass sich ein Fluoreszenzgrad von 1+ ergibt. Der niedrigste berichtbare Fluoreszenzgrad beträgt 1+.

   Nicht reaktives Kontrollserum (N) (1:40): Eine 1:40-Verdünnung des FTA Serum Non-Reactive herstellen; dazu 0,05 mL (50 µL) Serum zu 1,95 mL FA Buffer (PBS) hinzugeben.

   Unspezifisches Kontrollserum – nicht absorbiert (unspezifische Reaktivität von ≥ 2+): In 0,2 mL FA Buffer (PBS) 0,05 mL FTA Sorbent Control auflösen.

   Unspezifisches Kontrollserum – absorbiert (nicht reaktiv, – bis ±): In 0,2 mL FTA Sorbent 0,05 mL FTA Sorbent Control auflösen.

   Unspezifische Färbungskontrolle – nicht absorbiert: Hierfür 0,03 mL unverdünnten FA Buffer (PBS) verwenden.

   Unspezifische Färbungskontrolle – absorbiert: Hierfür 0,03 mL unverdünntes FTA Sorbent verwenden.
3. **FTA Antigen-Ausstriche:** Die zuvor gekennzeichneten FTA Antigen-Ausstriche mit 0,03 mL des entsprechenden (gemäß den obigen Angaben zubereiteten) Test- oder Kontrollserums bedecken. Dabei darauf achten, dass der gesamte Ausstrich bedeckt wird.
4. Die Objektträger in eine Feuchtigkeitskammer geben, um Verdunstung zu verhüten und 30 min lang bei 35 – 37 °C inkubieren.
5. Die Objektträger in einen Objektträger-Halter einsetzen und folgendermaßen abspülen:
   - Unter fließendem FA Buffer 5 sec lang abspülen.
   - In FA Buffer 5 min lang einweichen.
   - Zum „Schütteln“ 30 Mal in den Puffer eintauchen und wieder herausziehen.
   - Das Einweichen und Schütteln in frischem Puffer wiederholen.
   - Unter fließendem destilliertem Wasser 5 sec lang abspülen.
   - Mit saugfähigem Papier behutsam trocken tupfen.
6. **FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit):** Das Konjugat unter Verwendung von 2%igem Tween 80 in FA Buffer auf seinen (wie oben ermittelten) Funktionstiter verdünnen.
7. **FTA Antigen-Ausstriche:** Jeden Test- und Kontrollausstrich mit ca. 0,03 mL verdünntem FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) bedecken. Gleichmäßig verteilen, so dass der gesamte Ausstrich bedeckt ist.
8. Die Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. Die Objektträger unverzüglich mit einem kleinen Tropfen FA Mounting Fluid pH 7.2 fixieren und mit einem Deckplättchen abdecken. Dabei darauf achten, dass in der Fixierungsflüssigkeit keine Luftbläschen verbleiben.

10. Mit Hilfe der oben beschriebenen Mikroskop-Konfiguration sofort die Fluoreszenzstärke der Objektträger untersuchen. Falls diese Untersuchung erst später stattfinden kann, die Objektträger im Dunkeln lagern und innerhalb von 4 h untersuchen. Die Ergebnisse sind nur bei zufrieden stellendem Qualitätskontrollmuster gültig.
11. Die nicht reaktiven Kontroll-Objektträger mittels Dunkelfeld-Mikroskop im Hinblick auf das Vorliegen von Treponemen überprüfen.

Qualitätssicherung durch den Anwender

Die Reagenzien gemäß den obigen Anweisungen rehydrieren und verdünnen. Wie beschrieben testen. Tests, welche nicht die folgenden Kontrollergebnisse erbringen, sind nicht zufrieden stellend und sollten nicht berichtet werden.[4,11]

Getestetes Serum	Zu erwartende Fluoreszenz	Interpretation
Reaktives Kontrollserum - nicht absorbiert	4+	Reaktiv
Reaktives Kontrollserum - absorbiert	3+ bis 4+	Reaktiv
Minimal reaktives Kontrollserum	1+	Reaktiv
Nicht reaktives Kontrollserum	N	Nicht reaktiv
Unspezifische Serumkontrolle - nicht absorbiert	2+ bis 4+	Reaktiv
Unspezifische Serumkontrolle – absorbiert	N bis ±	Nicht reaktiv
Unspezifische Färbungskontrolle - nicht absorbiert	N	Nicht reaktiv
Unspezifische Färbungskontrolle - absorbiert	N	Nicht reaktiv

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten NCCLS-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

ERGEBNISSE

Die Treponemen-Fluoreszenzstärke unter Verwendung der Serumkontrolle 1+ als Messstandard aufzeichnen und folgendermaßen berichten. Alle Proben, deren Fluoreszenzgrad beim ersten Test 1+ beträgt, einem Wiederholungstest unterziehen.

Fluoreszenzstärke	Erster Test	Wiederholungs-test	Bericht
Mäßig bis stark	2+ bis4+	NZ	Reaktiv
Der Kontrolle 1+ vergleichbar	1+	>1+	Reaktiv
	1+	1+	Minimal reaktiv*
	1+	<1+	Nicht reaktiv
Sichtbare Färbung, jedoch <1+	± bis <1+	NZ	Nicht reaktiv
Nicht vorhanden oder vage erkennbar, nicht deutlich	–	NZ	Nicht reaktiv
„Mottenfraß" oder „Perlen"			Atypisch†

*Zweideutig.

†Atypische oder Perlen-Fluoreszenzmuster wurden bei Patienten mit Lupus oder anderen Autoimmunerkrankungen vermeldet.[11]

Proben mit Messwerten von 1+ beim ersten Test und Wiederholungstestwerten von mindestens 1+ werden als reaktiv berichtet. Alle anderen Ergebnisse werden als nicht reaktiv berichtet.

Für nicht reaktive Proben ist kein Wiederholungstest erforderlich.

Liegen keine Anamnese- oder klinischen Indizien für eine Treponemen-Infektion vor, legen zweideutige Testergebnisse (siehe Tabelle) die Notwendigkeit des Testens einer zweiten Probe nahe, welche 1 – 2 Wochen nach der ersten Probe entnommen werden sollte.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

1. In Fällen, in denen Treponema-Testergebnisse und klinisches Urteil nicht übereinstimmen, den Treponema-Test wiederholen und zusätzliche klinische und Anamnesedaten einholen. Ergibt sich auch weiterhin keine Übereinstimmung, die Probe für zusätzliche Bestätigungstests an ein Referenzlabor übersenden (z.B. an das Landesgesundheitsamt). Die letztendliche Diagnose sollte sich auf das klinische Urteil eines Spezialisten mit umfassender Erfahrung auf dem Gebiet der Geschlechtskrankheiten stützen.[2,3]
2. Der Test sollte nicht zur Verlaufskontrolle des Therapieerfolgs herangezogen werden und stellt auch keine zuverlässige Methode für die Erkennung neuer unbehandelter Fälle im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen dar.
3. „Atypische" Fluoreszenz und falsch positive Ergebnisse werden mit Patienten assoziiert, die an aktiven systemischen, diskoiden und arzneimittelinduzierten Formen von Lupus erythematodes[12-15] und anderen Autoimmunerkrankungen leiden.
4. Bei älteren Patienten können sich ungeklärte FTA-ABS-Reaktionen ergeben.
5. Die Entscheidung, ob eine Messung schwach oder vage erkennbar ist, kann schwierig sein. Diese Entscheidungsfällung ist jedoch von größter Bedeutung, da bei nicht reaktiven (vage erkennbar bis nicht vorhanden) Seren kein Wiederholungstest durchgeführt wird.
6. Der FTA-ABS-Test kann bei Personen reaktiv sein, die aus Gebieten stammen, in denen Frambösie- oder Pinta-Endemien aufgetreten sind oder noch gegeben sind.

LEISTUNGSMERKMALE[16]

In einer von Pope, Hunter und Feeley[16] im US-amerikanischen Seuchenschutzamt Centers for Disease Control in Atlanta (im Bundesstaat Georgia) durchgeführten Studie wurde die Leistung des FTA-ABS-Tests mit der eines ELISA-Tests, der des VDRL-Objektträgertests und der des MHA-TP-Tests verglichen. Es wurden zweihundertundsiebenundneunzig (297) Seren getestet, wobei ein enzymgebundener Immunosorbensassay (ELISA), der VDRL-Objektträgertest, der FTA-ABS-Test und der Mikro-Hämagglutinationsassay auf *T. pallidum*-Antikörper (MHA-TP) zum Einsatz kamen. Tabelle 1 im Folgenden zeigt einen Vergleich der Testreaktivität nach Krankheitskategorie, der sich beim Testen von 75 Seren von syphilitischen Personen und 222 Seren von nicht syphilitischen Personen ergab.[16]

Tabelle 1

Kategorie	Getestete Anzahl	Anzahl mit Reaktivität bei: FTA-ABS	ELISA	MHA-TP	VDRL
Syphilis im Primärstadium					
Unbehandelt	22	22	17	9	17
Behandelt	2	2	1	2	1
Syphilis im Sekundärstadium					
Unbehandelt	8	8	8	6	8
Behandelt	12	12	12	12	12
Syphilis in der Latenzphase					
Unbehandelt	13	13	12	12	10
Behandelt	10	10	10	9	9
Behandlung unbekannt	1	1	1	1	1
Fragliche Latenz	3	3	3	3	0
Neurosyphilis	3	3	2	2	0
Kardiovaskuläre Syphilis	1	1	1	1	0
Keine Syphilis					
Vermutlich normal	178	1	1	1	0
Biologisch falsch positiv	15	1	0	0	7
Andere Erkrankungen außer Syphilis	29	1	1	0	1

In Tabelle 2 im Folgenden sind die Empfindlichkeiten und Spezifitäten jeder im Rahmen dieser Studie veröffentlichten Methode aufgeführt.[16]

Tabelle 2

Test	Empfindlichkeit	Spezifität
FTA-ABS	100%	97,8%
ELISA	89,3%	98,5%
MHA-TP	76%	98,2%
VDRL	93,3%	92,7%

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
223441	**Difco** FTA Antigen, 1 mL
224401	**Difco** FTA Serum Non-Reactive, 5 mL
224391	**Difco** FTA Serum Reactive, 5 mL
232591	**Difco** FTA Sorbent, 5 mL
232592	**Difco** FTA Sorbent, 6 x 5 mL
232661	**Difco** FTA Sorbent Control, 6 x 0,5 mL
223143	**Difco** FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	**Difco** FA Buffer, Dried, 100 g
224491	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 1 mL
224492	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 5 mL
223291	**Difco** FA Mounting Fluid pH 7.2, 6 x 5 mL
231181	**Difco Tween** 80, 100 g

LITERATUR: S. „References" im englischen Text.

FTA-ABS-Testverfahren **Kurzübersicht**

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5
Seren und Reagenzien vorbereiten.	Seren verdünnen.	Test-/Kontrollserum zu entsprechenden FTA Antigen-Ausstrichen hinzugeben.	Konjugat zu FTA Antigen-Ausstrichen hinzugeben.	Test- und Kontrollseren-reaktionen aufzeichnen. Bestätigen, dass die Kontrollseren die erwarteten Ergebnisse erbrachten.
FTA Antigen	**FTA Antigen-Ausstrich**			
Mit 1 mL destilliertem Wasser rehydrieren. Ausstriche vorbereiten. Mit Aceton fixieren. Als „FTA Antigen-Ausstrich" verwenden.	Eine ausreichende FTA Antigen-Ausstrichmenge für alle zu untersuchenden Test- und Kontrollseren auftauen, trocknen und kennzeichnen.			
		Testserum (Patientenserum)		
Bei 56 °C 30 min lang erwärmen bzw. bereits zuvor erwärmtes Serum 10 min lang aufwärmen.	Durch Zugabe von 0,05 mL Serum zu 0,2 mL FTA Sorbent im Verhältnis 1:5 verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL Testserum geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	Abhängig von Antikörperstatus bzw. Testserum.
FTA Serum Reactive		**Reaktives Kontrollserum (4+) – nicht absorbiert**		
Mit 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren. Bei 56 °C 30 min lang erhitzen.	Durch Zugabe von 0,05 mL FTA Serum Reactive zu 0,2 mL FA Buffer im Verhältnis 1:5 verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL reaktives Kontrollserum – nicht absorbiert geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	Reaktiv (4+)
		Reaktives Kontrollserum (4+) – absorbiert		
	Durch Zugabe von 0,05 mL FTA Serum Reactive zu 0,2 mL FTA Sorbent im Verhältnis 1:5 verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL reaktives Kontrollserum – absorbiert geben. Inkubieren, ausstreichen. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	Reaktiv (3+ bis 4+)
		Minimal reaktives Kontrollserum (1+)		
	FTA Serum Reactive mit FA Buffer auf einen Fluoreszenzgrad von 1+ (Kennzeichnungstiter) verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL minimal reaktives Kontrollserum geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	Reaktiv (1+)
FTA Serum Non-Reactive		**Nicht reaktives Kontrollserum**		
Mit 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren. Bei 56 °C 30 min lang erhitzen.	Durch Zugabe von 0,05 mL FTA Serum Non-Reactive zu 1,95 mL FA Buffer im Verhältnis 1:40 verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL nicht reaktives Kontrollserum geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	N – Nicht reaktiv
FTA Sorbent Control		**Unspezifische Serumkontrolle – nicht absorbiert**		
Mit 0,5 mL destilliertem Wasser rehydrieren. Bei 56 °C 30 min lang erhitzen.	Durch Zugabe von 0,05 mL FTA Sorbent Control zu 0,2 mL FA Sorbent im Verhältnis 1:5 verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL unspezifisches Kontrollserum – nicht absorbiert geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	Reaktiv (2+ bis 4+)
		Unspezifische Serumkontrolle – absorbiert		
	Durch Zugabe von 0,05 mL FTA Sorbent Control zu 0,2 mL FA Sorbent im Verhältnis 1:5 verdünnen.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL unspezifisches Kontrollserum – absorbiert geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	N bis ± nicht reaktiv
FA Buffer, Dried		**Unspezifische Serumkontrolle – nicht absorbiert**		
In 1 L destilliertem Wasser 10 g auflösen.	Als Verdünnungsmittel (siehe oben) und als unspezifische Färbungskontrolle – nicht absorbiert 0,03 mL unverdünnten FA Buffer verwenden.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL unspezifische Färbungskontrolle – nicht absorbiert geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	N – Nicht reaktiv
FTA Sorbent		**Unspezifische Färbungskontrolle – absorbiert**		
Mit 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren.	Als Verdünnungsmittel (siehe oben) und als unspezifische Färbungskontrolle – absorbiert 0,03 mL unverdünntes FTA Sorbent verwenden.	Auf einen FTA Antigen-Ausstrich 0,03 mL unspezifische Färbungskontrolle – absorbiert geben. Den Ausstrich inkubieren. Abspülen.	Auf den Ausstrich 0,03 mL Konjugat geben. Objektträger inkubieren, abspülen und fixieren. Unter dem Mikroskop untersuchen.	N – Nicht reaktiv
FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)				
Mit 1 mL bzw. 5 mL destilliertem Wasser rehydrieren. Bei neuen Chargen den Titer ermitteln.	Mit 2%igem Tween auf den Kennzeichnungstiter verdünnen. Als „Konjugat" verwenden.			
Tween 80				
Tween 80 und FA Buffer auf 56 °C erwärmen. Zu 98 mL FA Buffer 2 mL Tween 80 hinzugeben. Auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen. Als „2%iges Tween" verwenden.				

BD Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid pH 7,2

Italiano

USO PREVISTO

Questi reagenti sono usati nel test FTA-ABS (assorbimento anticorpale treponemico in fluorescenza), una procedura anticorpale in fluorescenza indiretta per la rilevazione degli anticorpi umani contro *Treponema pallidum*, l'agente eziologico della sifilide.

I reagenti Difco FTA non sono stati approvati dall'FDA per l'uso nei test (di screening) di donatori di sangue o plasma.[1]

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Treponema pallidum è l'agente eziologico della sifilide, un'infezione cronica con numerose manifestazioni cliniche che compaiono in stadi distinti la cui rilevazione richiede diversi test di laboratorio specifici.

Poiché le manifestazioni cliniche della sifilide possono essere confuse con quelle di altre malattie infettive o di condizioni non infettive che provocano lesioni cutanee, una diagnosi appropriata deve includere l'esame microscopico del materiale delle lesioni e i risultati sieriologici.[2]

Il test FTA-ABS è un test diagnostico standard per la sifilide secondo quanto definito dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Altri test treponemici standard comprendono il test di assorbimento anticorpale treponemico in fluorescenza a doppia colorazione (FTA-ABS DS) e il test di microhemoagglutinazione per gli anticorpi anti *Treponema pallidum* (MHA-TP).

I test con antigene treponemico, come per esempio FTA-ABS, sono usati a scopo di conferma nei casi diagnostici in cui il test non treponemico iniziale risulta reattivo. Il test FTA-ABS è utile anche nel caso di pazienti i cui riscontri clinici, anamnestici o epidemiologici di sifilide non concordino con i test non treponemici. La persistente reattività – talvolta per tutta la vita – del test FTA-ABS nei casi di sifilide trattati, ne riduce al minimo l'impiego per il monitoraggio della risposta alla terapia. Il test FTA-ABS è pertanto inaffidabile anche ai fini della rilevazione – in ricerche epidemiologiche – di nuovi casi non trattati. Il test non deve essere usato come procedura di screening di routine.[3,4] La probabilità di ottenere un risultato reattivo per il test FTA-ABS in vari stadi di sifilide non trattata è stata descritta come segue.[2]

Stadio di sifilide non trattata	% reattività
Primario	84
Secondario	100
Latente	100
Terziario (tardivo)	96

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il siero del paziente viene diluito 1:5 in un apposito reagente assorbente e stratificato su un vetrino da microscopio fissato con *T. pallidum*. Gli anticorpi eventualmente contenuti nel siero del paziente rivestono i treponemi sul vetrino. Viene quindi aggiunta immunoglobulina anti-umana marcata con fluoresceina, che si combina con gli anticorpi del paziente già adesi a *T. pallidum*, sviluppando spirochete colorate con fluoresceina osservabili con un microscopio a fluorescenza.[5,6]

REAGENTI

Difco FTA Antigen (conosciuto anche come antigene *T. pallidum*) è una sospensione costituita da un ceppo liofilizzato, standardizzato, ucciso di *T. pallidum* (ceppo Nichols).

Difco FTA Serum Reactive è un siero umano sifilitico liofilizzato, standardizzato, contenente timerosal allo 0,02% come conservante, che viene usato per preparare quanto segue:

Siero di controllo reattivo (4+) – Non assorbito
Siero di controllo reattivo (4+) – Assorbito
Siero di controllo minimamente reattivo (1+)

È usato come controllo positivo nel test FTA-ABS.

Difco FTA Serum Non-Reactive è un siero umano non sifilitico liofilizzato, standardizzato, contenente timerosal allo 0,02% come conservante, che viene usato per preparare il siero di controllo non reattivo (N). È usato come controllo negativo nel test FTA-ABS.

Difco FTA Sorbent è un estratto liofilizzato, standardizzato, del treponema Reiter non patogeno *(Treponema phagedenis)* preparato da brodo di coltura, che viene usato per rimuovere gli anticorpi treponemici non patogeni durante la preparazione del campione da testare.

Difco FTA Sorbent Control è un siero umano non sifilitico liofilizzato, standardizzato, contenente timerosal allo 0,02% come conservante. Viene usato per preparare il Siero di controllo non specifico – Non assorbito, che evidenzia una reattività non specifica di almeno 2+ a una diluizione 1:5 in FA Buffer e il Siero di controllo non specifico – Assorbito, che essenzialmente non dimostra alcuna reattività a una diluizione 1:5 in FTA Sorbent.

Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) è una globulina liofilizzata anti-umana coniugata con fluoresceina (FITC) contenente timerosal allo 0,02% come conservante, usata per evidenziare la presenza di anticorpi anti sifilide umani sull'antigene treponemico.

Difco Tween 80 è polisorbato 80 (U.S.P.), usato per preparare Tween 80 al 2%, che funge da agente disperdente.

Difco FA Buffer, Dried è una soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS) che, una volta reidratata, costituisce una soluzione di NaCl allo 0,85% tamponata a pH 7,2. **Difco** FA Buffer, Dried è usato per preparare quanto segue:

Siero di controllo reattivo (4+) – Non assorbito
Siero di controllo minimamente reattivo (1+)
Siero di controllo non reattivo (N)
Controllo di colorazione non specifico – Non assorbito

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 è una glicerina standardizzata, grado reagente, corretta a pH 7,2 da usare nell'allestimento di campioni su vetrini da esaminare con microscopio a fluorescenza.

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. **Difco FTA Serum Reactive**
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent Control

   AVVERTENZA! REAGENTI A POTENZIALE RISCHIO BIOLOGICO. Ogni unità di donatore usata nella preparazione di questi reagenti è risultata negativa (non ripetutamente reattiva) ai test – condotti con una metodica approvata dalla FDA – per la determinazione degli anticorpi anti HIV (virus dell'immunodeficienza umana) e dell'HBsAg (antigene di superficie dell'epatite B).

   Poiché nessuna metodica di test può garantire con certezza l'assenza di HIV, virus dell'epatite B o altri agenti infettivi, manipolare questi reagenti in conformità alle norme del Livello di Sicurezza Biologica 2 (BSL 2) raccomandate per campioni di sangue o siero umano potenzialmente infetto nel manuale *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 1999, redatto da Centers for Disease Control/National Institutes of Health.
3. **Difco FTA Antigen**
   Difco FTA Serum Reactive
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent
   Difco FTA Sorbent Control
   Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)

   La confezione di questo prodotto contiene gomma naturale secca.
4. I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".[7-10]

Conservazione - Conservare i prodotti sigillati come specificato di seguito.

Difco FTA Antigen	2 – 8 °C
Difco FTA Serum Reactive	2 – 8 °C
Difco FTA Serum Non-Reactive	2 – 8 °C
Difco FTA Sorbent	2 – 8 °C
Difco FTA Sorbent Control	2 – 8 °C
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	2 – 8 °C, al buio
Difco Tween 80	15 – 30 °C
Difco FA Buffer, Dried	Al di sotto di 30 °C
Difco FA Mounting Fluid pH 7.2	15 – 30 °C

Difco FTA Antigen reidratato, conservato a 2 – 8 °C, è stabile per 1 settimana.

Gettare **Difco** FA Buffer se presenta torbidità o crescita di muffe. Gettare 2% Tween 80 se presenta precipitati o variazioni di pH.

L'esposizione prolungata dei reagenti a temperature diverse da quelle indicate può danneggiare i prodotti.

Deterioramento del prodotto – La data di scadenza si riferisce al prodotto in confezione integra e conservato come prescritto. Non usare il prodotto se appare indurito, scolorito o presenta altri segni di deterioramento.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Sieri per il test – In una provetta pulita e asciutta, non contenente anticoagulanti, raccogliere un campione sanguigno mediante venipuntura in asepsi. Una volta formatosi il coagulo, centrifugare il campione a 1.500 – 2.000 rpm per 5 min per ottenere il siero per il test. Conservare i campioni a temperatura ambiente per non più di 4 h oppure a 2 – 8 °C per un massimo di 5 giorni; i campioni di siero possono essere conservati a temperature uguali o inferiori a –20 °C.

Sieri per il test e di controllo – Lasciare equilibrare i sieri a temperatura ambiente, quindi riscaldarli a 56 °C per 30 min. Il giorno del test, riscaldare nuovamente per 10 min i sieri già precedentemente riscaldati. Prima del test, lasciare raffreddare a temperatura ambiente. La contaminazione batterica o un'eccessiva emolisi può rendere un campione inadatto al test. Non testare campioni che presentano contaminazione batterica o eccessiva emolisi.

PROCEDURA

Materiali forniti

Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid, pH 7.2

Materiali richiesti ma non forniti

Timer
Pipette sierologiche, 0,2 mL, 1 mL, 5 mL
Micropipettatori in grado di dispensare 10 – 200 µL
Provette, 12 x 75 mm
Bagnomaria (56 °C)
Vortex
Ansa in platino, 2 mm, 26G
Vetrini, semplici o smerigliati, 2,54 x 7,62 cm, spessore 1 mm, con cerchi di conta 2 x 1 cm
Piastra di colorazione con portavetrini rimovibile
Supporto o portavetrini
Camera di umidificazione
Acetone
Carta assorbente
Acqua purificata
Incubatore, 35 – 37 °C
Olio, per immersione
Vetrini coprioggetti, n. 1, quadr. 22 mm
Set microscopio a fluorescenza:
Lampade: HBO-50, HBO-100, HBO-200 o XBO-150 allo xeno; 6X 5A al tungsteno
Oculare: 10X
Obiettivo: 10X, 40X (fluorite)
Filtri: BG-12 o KP490, K515 o K530
Condensatore: campo scuro D1,20-1,40

Preparazione dei reagenti

FTA Antigen – Reidratare con 1 mL di acqua purificata e roteare per dissolvere completamente il contenuto. Questa soluzione conterrà circa 3,5 x 10^7 treponemi per mL. Mescolare accuratamente usando una pipetta monouso con bulbo in gomma, prelevando la sospensione ed espellendola dalla pipetta 8 – 10 volte per separare gli aggregati treponemici e assicurare una distribuzione uniforme dei treponemi. Confermare l'uniformità della distribuzione mediante esame in campo scuro. Usare tutto il quantitativo di FTA Antigen per preparare gli strisci di antigene il giorno in cui viene reidratato. Con 1 mL di antigene, si possono preparare circa 200 – 300 vetrini.

Preparare gli strisci FTA Antigen nel modo seguente.

1. Pulire i vetrini con i cerchi di conta usando una garza pulita e, se necessario, alcol per rimuovere particelle di polvere.
2. Con l'ausilio di un'ansa in platino (2 mm, 26G), strisciare 1 ansata di FTA Antigen ricostituito entro i 2 cerchi. Lasciare asciugare all'aria, a temperatura ambiente, per almeno 15 min.
3. Immergere il vetrino asciutto in acetone per 10 min per fissare lo striscio di antigene treponemico sul vetrino; lasciare asciugare all'aria. Fissare non più di 50 vetrini ogni 200 mL di acetone.
4. Usare i vetrini immediatamente oppure conservarli a temperature uguali o inferiori a –20 °C dopo la fissazione con acetone. Scongelare prima dell'uso; non ricongelare. Usare entro 1 anno, ma soltanto se i controlli hanno dato risultati soddisfacenti.

FTA Serum Reactive – Reidratare con 5 mL di acqua purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto. Suddividere in aliquote di 0,4 mL e conservare a temperature uguali o inferiori a –20 °C. Non ricongelare le aliquote scongelate. Ogni flacone da 5 mL consente di eseguire circa 12 test. Prima dell'uso, riscaldare questo siero a 56 °C per 30 min.

FTA Serum Non-Reactive – Reidratare con 5 mL di acqua purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto. Suddividere in aliquote di 0,4 mL e conservare a temperature uguali o inferiori a –20 °C. Ogni flacone da 5 mL consente di eseguire circa 90 – 100 test. Prima dell'uso, riscaldare questo siero a 56 °C per 30 min.

FTA Sorbent – Reidratare con 5 mL di acqua purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto. Conservare a 2 – 8 °C oppure aliquotare e conservare a –20 °C. La quantità di FTA Sorbent usata per ogni campione o siero da testare è 0,2 mL. La quantità di FTA Sorbent necessaria per 3 controlli è 0,6 mL. Con 5 mL di FTA Sorbent si possono eseguire circa 20 – 25 test.

FTA Sorbent Control – Reidratare con 0,5 mL di acqua purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto. Suddividere in aliquote di 0,25 mL e conservare a temperature uguali o inferiori a –20 °C. Per ogni test sono necessari 0,1 mL di FTA Sorbent Control. Data l'evaporazione dovuta al riscaldamento, ogni flacone da 0,5 mL consente di eseguire circa 2 test. Prima dell'uso, riscaldare questo siero a 56 °C per 30 min.

FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) – Ricostituire con 1 o 5 mL di acqua purificata, a seconda delle istruzioni riportate sull'etichetta. Suddividere in aliquote di 0,5 mL e conservare a temperature uguali o inferiori a –20 °C. Ogni lotto è provvisto di un titolo di diluizione. Poiché le condizioni e le apparecchiature differiscono da un laboratorio all'altro, è necessario titolare e testare un nuovo lotto di coniugato con il set del microscopio a fluorescenza al momento usato.[3,4,11]

1. Preparare diluizioni seriali in Tween 80 al 2%, incluso il titolo specificato sul flacone.
2. Testare ogni diluizione, in conformità alla Procedura del test, con il Siero di controllo reattivo (4+) e il Controllo di colorazione non specifico.
3. Testare un lotto conosciuto di coniugato usando il Siero di controllo reattivo (4+), il Siero di controllo minimamente reattivo (1+) e il Controllo di colorazione non specifico come controlli dei reagenti e delle condizioni del test.
4. La diluizione da usare nel test è quella che produce 1 diluizione al raddoppio inferiore all'endpoint 4+. L'endpoint 4+ corrisponde alla diluizione più elevata di coniugato che sviluppa una fluorescenza 4+ con il Siero di controllo reattivo (4+).

FA Buffer, Dried – Dissolvere 10 g in 1 mL di acqua purificata e roteare delicatamente per dissolvere completamente il contenuto. Conservare a 2 – 8 °C. Usare la soluzione se non presenta torbidità e crescita di muffe.

Tween 80 – Riscaldare a 56 °C, a bagnomaria, il flacone di Tween 80 e un matraccio contenente 98 mL di FA Buffer. Dispensare 2 mL di Tween 80 nel tampone e risciacquare accuratamente la pipetta nel tampone. Controllare il pH e correggere a 7,2 con 1N NaOH. Gettare in caso di sviluppo di precipitato o variazioni di pH.

Procedura del test

Questa procedura è conforme alle metodiche pubblicate dalla American Public Health Association.[6,11]

1. **Strisci FTA Antiqen –** Ottenere strisci preparati in precedenza, scongelare e asciugare se appropriato e identificare l'estremità smerigliata dei vetrini per la corrispondenza con ogni test e siero di controllo da testare.
2. Preparare i seguenti sieri per il test e di controllo in provette identificate in modo appropriato, non più di 30 min prima del test e mescolare accuratamente (almeno 8 volte).

   Siero per il test (1:5) – Diluire 0,05 mL di siero riscaldato (o nuovamente riscaldato) per il test in 0,2 mL di FTA Sorbent.

   Siero di controllo reattivo (4+) – Non assorbito – Diluire 0,05 mL di FTA Serum Reactive in 0,2 mL di FA Buffer (PBS).

   Siero di controllo reattivo (4+) – Assorbito – Diluire 0,05 mL di FTA Serum Reactive in 0,2 mL di FTA Sorbent.

   Siero di controllo minimamente reattivo (1+) – Diluire FTA Serum Reactive – come indicato sull'etichetta – in FA Buffer (PBS) in modo da ottenere una fluorescenza 1+. Il grado minimo di fluorescenza refertabile come reattivo è 1+.

   Siero di controllo non reattivo (N) (1:40) – Preparare una diluizione 1:40 di FTA Serum Non-Reactive dispensando 0,05 mL (50 µL) di siero in 1,95 mL di FA Buffer (PBS).

   Controllo siero non specifico – Non assorbito (reattività non specifica ≥ 2+) – Diluire 0,05 mL di FTA Sorbent Control in 0,2 mL di FA Buffer (PBS).

   Controllo siero non specifico – Assorbito (non reattivo, da – a±) – Diluire 0,05 mL di FTA Sorbent Control in 0,2 mL di FTA Sorbent.

   Controllo di colorazione non specifico – Non assorbito – Usare 0,03 mL di FA Buffer (PBS) non diluito.

   Controllo di colorazione non specifico – Assorbito – Usare 0,03 mL di FTA Sorbent non diluito.
3. **Strisci FTA Antiqen -** Coprire gli strisci FTA Antigen precedentemente identificati con 0,03 mL del corrispondente siero di controllo o per il test preparato come sopra, assicurandosi di coprire l'intero striscio.
4. Porre i vetrini in una camera di umidificazione per evitare l'evaporazione e incubare a 35 – 37 °C per 30 min.
5. Porre i vetrini in un portavetrini e risciacquare nel modo seguente.
   • Risciacquare irrorando con FA Buffer per 5 sec.
   • Immergere in FA Buffer per 5 min.
   • Agitare immergendo ed estraendo dal tampone 30 volte.
   • Ripetere l'immersione e l'agitazione in tampone fresco.
   • Risciacquare in acqua distillata per 5 sec.
   • Asciugare tamponando delicatamente con carta assorbente.
6. **FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) –** Diluire il coniugato portandolo al titolo per il test (determinato come sopra) usando Tween 80 al 2% in FA Buffer.
7. **Strisci FTA Antiqen –** Coprire ogni striscio per il test e di controllo con circa 0,03 mL di FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) diluita. Distribuire uniformemente per coprire tutto lo striscio.
8. Ripetere i punti 4 e 5.
9. Allestire i vetrini immediatamente usando una piccola goccia di FA Mounting Fluid pH 7.2 e applicare un vetrino coprioggetti, prestando attenzione a non includere bolle d'aria nel fluido per l'allestimento dei vetrini.
10. Esaminare immediatamente i vetrini al microscopio per verificare l'intensità della fluorescenza, usando il set per microscopio sopra descritto. Se è necessario rinviare la lettura, conservare i vetrini al buio ed esaminarli entro 4 h. I risultati sono validi soltanto se il pattern del controllo di qualità è soddisfacente.
11. Verificare la presenza di treponemi sui vetrini di controllo non reattivo mediante microscopia in campo scuro.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Reidratare e diluire i reagenti secondo le istruzioni sopra riportate. Testare come descritto. I test che non presentano i seguenti risultati di controllo sono insoddisfacenti e non devono essere refertati.[4,11]

Siero testato	Fluorescenza attesa	Interpretazione
Siero di controllo reattivo – Non assorbito	4+	Reattivo
Siero di controllo reattivo – Assorbito	3+ a 4+	Reattivo
Siero di controllo minimamente reattivo	1+	Reattivo
Siero di controllo non reattivo	N	Non Reattivo
Controllo siero non specifico – Non assorbito	2+ a 4+	Reattivo
Controllo siero non specifico – Assorbito	N a ±	Non Reattivo
Controllo di colorazione non specifico – Non assorbito	N	Non Reattivo
Controllo di colorazione non specifico – Assorbito	N	Non Reattivo

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione NCCLS in merito.

RISULTATI

Usando il controllo siero 1+ come standard di letture, registrare l'intensità della fluorescenza dei treponemi e refertarla come segue. Ritestare tutti i campioni che al test iniziale hanno sviluppato una fluorescenza di 1+.

Intensità della fluorescenza	Test iniziale	Nuovo test	Referto
Moderata – intensa	Da 2+ a 4+	NA	Reattivo
Equivalente a controllo 1+	1+	>1+	Reattivo
	1+	1+	Minimamente reattivo*
	1+	<1+	Non Reattivo
Colorazione visibile ma <1+	Da ± a <1+	NA	Non Reattivo
Nessuna o vagamente visibile, indistinta	–	NA	Non Reattivo
"A chiazze" o "perliforme"			Atipico†

*Risultato equivoco.

†Pattern di fluorescenza atipici o perliformi sono stati descritti in pazienti con lupus o altri malattie autoimmuni.[11]

I campioni con una lettura iniziale di 1+ e i campioni ritestati con una lettura di 1+ o maggiore sono refertati come reattivi. Tutti gli altri risultati sono refertati come non reattivi.

Non è necessario ritestare i campioni non reattivi.

Senza riscontri anamnestici o clinici di infezione treponemica, i risultati equivoci (vedere tabella) indicano la necessità di testare un secondo campione prelevato 1 – 2 settimane dopo il campione iniziale.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. In caso di discordanza tra i risultati dei test treponemici e la valutazione clinica, ripetere il test treponemico e raccogliere altre informazioni cliniche e anamnestiche. Se la discordanza persiste, inviare il campione a un laboratorio di riferimento, come per esempio il locale dipartimento di igiene, per ulteriori test di conferma. La diagnosi finale dipende dalla valutazione clinica di uno specialista in malattie sessualmente trasmesse.[2,3]
2. Non usare il test per seguire la risposta alla terapia né per rilevare - in ricerche epidemiologiche - nuovi casi non trattati.
3. Fluorescenza "atipica" e risultati falsamente positivi sono stati associati a pazienti affetti da varietà sistemiche, discoidi e farmaco-indotte di lupus erythematosus[12-15] e altre malattie autoimmuni.
4. I pazienti anziani possono manifestare reazioni FTA-ABS inspiegate.
5. La decisione circa l'interpretazione di una lettura come debole o vagamente visibile può talvolta essere difficile. La capacità di fare questa distinzione è decisiva in quanto un siero non reattivo (vagamente visibile o non reattivo) non viene ritestato.
6. Il test FTA-ABS può essere reattivo in soggetti provenienti da aree in cui la framboesia - o mal del pinto - è stata o è endemica.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE[16]

Le prestazioni del test FTA-ABS sono state comparate a un test ELISA, al test su vetrino VDRL e al test MHA-TP, in uno studio condotto da Pope, Hunter e Feeley[16] ai Centers for Disease Control in Atlanta, Georgia (USA). Duecentonovantasette (297) sieri sono stati testati mediante ELISA, test su vetrino VDRL, test FTA-ABS e test di microemo-agglutinazione per gli anticorpi anti *Treponema pallidum* (MHA-TP). La Tabella 1 seguente presenta una comparazione della reattività del test per categoria di malattia, riferita al test di 75 sieri di soggetti affetti da sifilide e 222 sieri di soggetti non affetti da sifilide.[16]

Tabella 1

Categoria	N. testato	N. con reattività a: FTA-ABS	ELISA	MHA-TP	VDRL
Sifilide primaria					
Non trattata	22	22	17	9	17
Trattata	2	2	1	2	1
Sifilide secondaria					
Non trattata	8	8	8	6	8
Trattata	12	12	12	12	12
Sifilide latente					
Non trattata	13	13	12	12	10
Trattata	10	10	10	9	9
Trattamento sconosciuto	1	1	1	1	1
Latente dubbia	3	3	3	3	0
Neurosifilide	3	3	2	2	0
Sifilide cardiovascolare	1	1	1	1	0
Non sifilide					
Presunta normale	178	1	1	1	0
Falsamente positiva biologica	15	1	0	0	7
Malattie diverse da sifilide	29	1	1	0	1

La Tabella 2 seguente elenca le sensibilità e specificità per ciascuna metodica pubblicata in questo studio.[16]

Tabella 2

Test	Sensibilità	Specificità
FTA-ABS	100%	97,8%
ELISA	89,3%	98,5%
MHA-TP	76%	98,2%
VDRL	93,3%	92,7%

DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
223441	**Difco** FTA Antigen, 1 mL
224401	**Difco** FTA Serum Non-Reactive, 5 mL
224391	**Difco** FTA Serum Reactive, 5 mL
232591	**Difco** FTA Sorbent, 5 mL
232592	**Difco** FTA Sorbent, 6 x 5 mL
232661	**Difco** FTA Sorbent Control, 6 x 0,5 mL
223143	**Difco** FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	**Difco** FA Buffer, Dried, 100 g
224491	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 1 mL
224492	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 5 mL
223291	**Difco** FA Mounting Fluid pH 7,2, 6 x 5 mL
231181	**Difco** Tween 80, 100 g

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Procedura del test FTA-ABS — **Schema abbreviato**

Fase 1.	Fase 2.	Fase 3.	Fase 4.	Fase 5.
Preparare i sieri e i reagenti.	Diluire i sieri.	Dispensare il siero per il test/di controllo sugli strisci FTA Antigen appropriati.	Dispensare il coniugato sugli strisci FTA Antigen.	Annotare le reazioni dei sieri per il test e di controllo. Verificare che i sieri di controllo producano i risultati attesi.
FTA Antigen	**Strisci FTA Antigen**			
Reidratare con 1 mL di acqua purificata. Preparare gli strisci. Fissare con acetone. Usare come "striscio FTA Antigen".	Scongelare, asciugare e identificare gli strisci FTA Antigen per la corrispondenza con ogni test e siero di controllo da testare.			
		Siero per il test (paziente)		
Riscaldare a 56 °C per 30 min oppure riscaldare nuovamente il siero precedentemente riscaldato per 10 min.	Diluire 1:5 dispensando 0,05 mL di siero in 0,2 mL di FTA Sorbent.	Dispensare 0,03 mL di siero per il test su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	A seconda dello stato anticorpale o del siero da testare.
FTA Serum Reactive		**Siero di controllo reattivo (4+) – Non assorbito**		
Reidratare con 5 mL di acqua purificata. Riscaldare a 56 °C per 30 min.	Diluire 1:5 dispensando 0,05 mL di FTA Serum Reactive in 0,2 mL di FA Buffer.	Dispensare 0,03 mL di Siero di controllo reattivo – Non assorbito su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	4+ Reattivo
		Siero di controllo reattivo (4+) — Assorbito		
	Diluire 1:5 dispensando 0,05 mL di FTA Serum Reactive in 0,2 mL di FTA Sorbent.	Dispensare 0,03 mL di Siero di controllo reattivo – Assorbito su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	Da 3+ a 4+ Reattivo
		Siero di controllo minimamente reattivo (1+)		
	Diluire FTA Serum Reactive in modo da ottenere una fluorescenza 1+ (titolo indicato in etichetta) in FA Buffer.	Dispensare 0,03 mL di Siero di controllo minimamente reattivo su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	1+ Reattivo
FTA Serum Non-Reactive		**Siero di controllo non reattivo**		
Reidratare con 5 mL di acqua purificata. Riscaldare a 56 °C per 30 min.	Diluire 1:40 dispensando 0,05 mL di FTA Serum Reactive in 1,95 mL di FA Buffer.	Dispensare 0,03 mL di Siero di controllo non reattivo su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	N - Non reattivo
FTA Sorbent Control		**Controllo siero non specifico - Non assorbito**		
Reidratare con 0,5 mL di acqua purificata. Riscaldare a 56 °C per 30 min.	Diluire 1:5 dispensando 0,05 mL di FTA Sorbent Control in 0,2 mL di FA Sorbent.	Dispensare 0,03 mL di Controllo siero non specifico – Non assorbito su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	Da 2+ a 4+ Reattivo
		Controllo siero non specifico - Assorbito		
	Diluire 1:5 dispensando 0,05 mL di FTA Sorbent Control in 0,2 mL di FTA Sorbent.	Dispensare 0,03 mL di Controllo siero non specifico – Assorbito su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	N - ± Non reattivo
FA Buffer, Dried		**Controllo siero non specifico - Non assorbito**		
Dissolvere 10 g di in 1 L di acqua purificata.	Usare 0,03 mL di FA Buffer non diluito come diluente (sopra) e come Controllo di colorazione non specifico – Non assorbito.	Dispensare 0,03 mL di Controllo di colorazione non specifico – Non assorbito su uno striscio FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	N - Non reattivo
FTA Sorbent		**Controllo di colorazione non specifico - Assorbito**		
Reidratare con 5 mL di acqua purificata.	Usare 0,03 mL di FTA Sorbent non diluito come diluente (sopra) e come Controllo di colorazione non specifico – Assorbito.	Dispensare 0,03 mL di Controllo di colorazione non specifico – Assorbito su uno striscio di FTA Antigen. Incubare lo striscio. Risciacquare.	Dispensare 0,03 mL di coniugato sullo striscio. Incubare, risciacquare e allestire il vetrino. Esaminare al microscopio.	N - Non reattivo
FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)				
Reidratare con 1 o 5 mL di acqua purificata. Determinare il titolo se si tratta di un nuovo lotto.	Diluire al titolo indicato in etichetta con Tween al 2%. Usare come "coniugato".			
Tween 80				
Riscaldare Tween 80 e FA Buffer a 56 °C. Dispensare 2 mL di Tween 80 in 98 mL di FA Buffer. Correggere il pH a 7,2. Usare come "Tween al 2%".				

BD Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid pH 7,2

Español

USO PREVISTO

Estos reactivos se utilizan en la prueba FTA-ABS (absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes). Dicha prueba constituye un procedimiento indirecto de anticuerpos fluorescentes para la detección de anticuerpos humanos contra el *Treponema pallidum*, el agente causante de la sífilis.

Los reactivos Difco FTA no cuentan con la aprobación de la FDA para su utilización en el análisis (prueba de detección) de donantes de sangre o plasma[1].

RESUMEN Y EXPLICACION

Treponema pallidum es el agente causante de la sífilis, una infección crónica con numerosas manifestaciones clínicas. Dichas manifestaciones ocurren en etapas distintas y la detección de cada una requiere pruebas de laboratorio diferentes.

Dado que las manifestaciones clínicas de la sífilis pueden confundirse con otras enfermedades infecciosas o con trastornos no infecciosos que causan lesiones cutáneas, el diagnóstico adecuado debe basarse en el examen microscópico de la muestra de la lesión y los resultados de las pruebas serológicas[2].

La FTA-ABS es una prueba de diagnóstico estándar para sífilis, tal como la definen los Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Entre otras pruebas treponémicas estándar se incluyen la prueba de tinción doble y absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS DS) y el ensayo de microhemaglutinación para anticuerpos de *Treponema pallidum* (MHA-TP).

Las pruebas de antígenos treponémicos, tales como la prueba FTA-ABS, se utilizan para confirmación en casos de diagnóstico, en los que la prueba no treponémica inicial es reactiva. La prueba FTA-ABS también es de utilidad para los pacientes con los que se suscitan discrepancias entre las pruebas no treponémicas y la evidencia clínica, epidemiológica y de historial de la sífilis. La reactividad persistente de la prueba FTA-ABS en un caso tratado de sífilis, a veces de por vida, minimiza su utilización para realizar un seguimiento de la respuesta al tratamiento. Por tanto, la prueba FTA-ABS tampoco es fiable para la detección de los casos nuevos no tratados en investigaciones epidemiológicas. La prueba no debe utilizarse como procedimiento de detección sistemática[3,4]. La probabilidad de obtener un resultado reactivo de la prueba FTA-ABS en diversas etapas de la sífilis sin tratar se ha reseñado de la siguiente manera[2]:

Etapa de sífilis sin tratar	% reactivo
Primaria	84
Secundaria	100
Latente	100
Terciaria (tardía)	96

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Se realiza una dilución de 1:5 con el suero del paciente en absorbente y en capas en un portaobjetos de microscopio con *T. pallidum*. Si el suero del paciente contiene anticuerpos, éstos recubrirán las treponemas en el portaobjetos. Se añade inmunoglobulina anti-humana marcada con fluoresceína. Se combina con los anticuerpos del paciente que ya se adhieren al *T. pallidum* y produce espiroquetas teñidas de fluoresceína que pueden observarse con un microscopio de fluorescencia[5,6].

REACTIVOS

Difco FTA Antigen (también conocido como antígeno de *T. pallidum*) es una suspensión inactivada, liofilizada y normalizada de *T. pallidum* (cepa Nichols).

Difco FTA Serum Reactive está formado por sueros humanos sifilíticos, liofilizados y normalizados, con timerosal al 0,02% como conservante. Se utiliza para preparar:

Suero de control reactivo (4+) – Sin absorber
Suero de control reactivo (4+) – Absorbido
Suero de control mínimamente reactivo (1+)

Se utiliza como control positivo en la prueba FTA-ABS.

Difco FTA Serum Non-Reactive está formado por sueros humanos no sifilíticos, liofilizados y normalizados, con timerosal al 0,02% como conservante. Se utiliza para crear suero de control no reactivo (N). Se utiliza como control negativo en la prueba FTA-ABS.

Difco FTA Sorbent es un extracto liofilizado normalizado de la treponema de Reiter no patógena *(Treponema phagedenis)* preparada a partir de cultivo de caldo. Se utiliza para quitar anticuerpos treponémicos no patógenos durante la preparación de la muestra de prueba.

Difco FTA Sorbent Control está formado por sueros humanos no sifilíticos, liofilizados y normalizados, con timerosal al 0,02% como conservante. Se utiliza para crear el Suero de control no específico – Sin absorber, que demuestra al menos 2+ de reactividad no específica en una dilución de 1:5 en FA Buffer, y el Suero de control no específico – Absorbido, que demuestra básicamente ninguna reactividad en una dilución de 1:5 en FTA Sorbent.

Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) es globulina anti-humana, liofilizada y conjugada con fluoresceína (FITC), con timerosal al 0,02% como conservante. Se utiliza para mostrar la presencia de anticuerpos sifilíticos humanos en el antígeno treponémico.

Difco Tween 80 es polisorbato 80, USP. Se utiliza para preparar Tween 80 al 2%, que actúa como agente dispersante.[a]

Difco FA Buffer, Dried es solución salina tamponada con fosfato (PBS) que, al rehidratarse, produce una solución de NaCl al 0,85% tamponada para lograr un pH de 7,2. **Difco** FA Buffer, Dried se utiliza para preparar:

Suero de control reactivo (4+) – Sin absorber
Suero de control mínimamente reactivo (1+)
Suero de control no reactivo (N)
Control de tinción no específico – Sin absorber

Difco FA Mounting Fluid pH 7.2 es glicerina normalizada, de grado analítico, ajustada a un pH de 7,2 para uso en la preparación de muestras en portaobjetos que han de observarse en microscopio de fluorescencia.

Advertencias y precauciones:

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. **Difco FTA Serum Reactive**
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent Control

   ¡ADVERTENCIA! REACTIVOS CON POSIBLE RIESGO BIOLOGICO. Cada unidad de donante utilizada en la preparación de estos reactivos se analizó y resultó ser reiteradamente no reactiva según un método con licencia de la FDA para detectar la presencia de anticuerpos al HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) y al HBsAg (antígeno de superficie de la hepatitis B).

   Debido a que ningún método de análisis puede ofrecer una garantía total de la ausencia de HIV, del virus de la hepatitis B o de otros agentes infecciosos, dichos reactivos deben manipularse adoptando las medidas de seguridad biológica de nivel 2, según lo recomendado para todo suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosos en el manual *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (1999) de los Centers for Disease Control/National Institutes of Health.
3. **Difco FTA Antigen**
   Difco FTA Serum Reactive
   Difco FTA Serum Non-Reactive
   Difco FTA Sorbent
   Difco FTA Sorbent Control
   Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)

   El envase de este producto contiene goma natural seca.
4. En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"[7-10] y las directrices del centro.

Almacenamiento: Almacenar los productos sin abrir como se detalla a continuación:

Difco FTA Antigen	2 – 8 °C
Difco FTA Serum Reactive	2 – 8 °C
Difco FTA Serum Non-Reactive	2 – 8 °C
Difco FTA Sorbent	2 – 8 °C
Difco FTA Sorbent Control	2 – 8 °C
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	2 – 8 °C en lugar oscuro
Difco Tween 80	15 – 30 °C
Difco FA Buffer, Dried	A menos de 30 °C
Difco FA Mounting Fluid pH 7.2	15 – 30 °C

Difco FTA Antigen (rehidratado) almacenado a 2 – 8 °C mantiene su estabilidad durante 1 semana.

Difco FA Buffer (rehidratado) que presente turbidez o moho debe desecharse. Desechar Tween 80 al 2% si muestra precipitado o cambio en el pH.

Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.

Deterioro del producto: La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro.

RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Suero de prueba: Recoger una muestra de sangre mediante punción venosa aséptica en un tubo seco y limpio sin anticoagulante. Después de que la muestra se coagule, centrifugarla a 1.500 – 2.000 rpm durante 5 min para obtener el suero de prueba. Almacenar las muestras a temperatura ambiente durante un máximo de 4 h o a 2 – 8 °C hasta 5 días; las muestras de suero pueden congelarse a –20 °C o menos.

Sueros de prueba y de control: Equilibrar los sueros a temperatura ambiente, luego calentar a 56 °C durante 30 min. Volver a calentar los sueros anteriormente calentados durante 10 min en el día del análisis. Enfriar a temperatura ambiente antes de realizar la prueba. Una muestra con contaminación bacteriana o hemólisis excesiva puede ser no apta. No se deben analizar dichas muestras.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

Difco FTA Antigen
Difco FTA Serum Reactive
Difco FTA Serum Non-Reactive
Difco FTA Sorbent
Difco FTA Sorbent Control
Difco FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)
Difco Tween 80
Difco FA Buffer, Dried
Difco FA Mounting Fluid, pH 7.2

Materiales necesarios pero no suministrados

Cronómetro
Pipetas serológicas de 0,2 mL; 1 mL; 5 mL
Micropipetas para suministrar 10 – 200 µL
Tubos de ensayo de 12 x 75 mm
Baño María (56 °C)
Mezclador tipo Vórtex
Asa de platino de 2 mm y calibre 26
Portaobjetos, transparentes o esmerilados, 2,54 x 7,62 cm, 1 mm espesor, grabados con círculos de 2 x 1 cm
Placa de tinción con soporte de portaobjetos desmontable
Placa o soporte para portaobjetos
Cámara húmeda
Acetona
Papel absorbente
Agua purificada
Incubadora, 35 – 37 °C
Aceite de inmersión
Cubreobjetos, Nº 1, cuadrados de 22 mm
Microscopio de fluorescencia:
Lámparas: HBO-50, HBO-100, HBO-200 o Xenon XBO-150; 6X 5A Tungsten
Ocular: 10X
Objetivo: 10X, 40X (fluorita)
Filtros: BG-12 o KP490, K515 o K530
Condensador: De campo oscuro D1,20 – 1,40

Preparación del reactivo

FTA Antigen: Rehidratar con 1 mL de agua purificada y girar hasta disolver por completo el contenido. Con esta solución se producirán aproximadamente 3,5 x 10^7 treponemas por mL. Mezclar bien con una pipeta desechable o pera de goma, extrayendo y expulsando la suspensión de la pipeta entre 8 y 10 veces para disolver los grupos treponémicos y asegurar una distribución uniforme de las treponemas. Confirmar la distribución uniforme mediante examen en campo oscuro. Utilizar todo el FTA Antigen para preparar los frotis de antígeno el día en que se rehidrata. Se pueden preparar aproximadamente entre 200 y 300 portaobjetos con 1 mL de antígeno.

Para preparar los frotis de FTA Antigen:

1. Limpiar los portaobjetos con círculos grabados con una gasa limpia y, si es necesario, alcohol para eliminar las partículas de polvo.
2. Utilizar un asa con guía de platino (de 2mm y calibre 26), realizar el frotis con 1 asa llena de FTA Antigen rehidratado dentro de los 2 círculos. Dejar secar al aire a temperatura ambiente durante al menos 15 min.
3. Sumergir el portaobjetos seco en acetona durante 10 min para fijar el frotis de antígeno treponémico al portaobjetos; dejar secar al aire. Repetir el procedimiento con no más de 50 portaobjetos por cada 200 mL de acetona.
4. Utilizar los portaobjetos de inmediato o almacenarlos a –20 °C o menos después de la fijación con acetona. Descongelar antes de usar; no volver a congelar. Utilizar en el plazo de 1 año, pero sólo si se obtienen resultados satisfactorios con los controles de prueba.

FTA Serum Reactive: Rehidratar con 5 mL de agua purificada y girar suavemente para disolver por completo el contenido. Dosificar en alícuotas de 0,4 mL y almacenar a –20 °C o menos. No volver a congelar la alícuota descongelada. Se pueden obtener aproximadamente 12 pruebas por cada frasco de 5 mL. Este suero debe calentarse a 56 °C durante 30 min antes de su utilización.

FTA Serum Non-Reactive: Rehidratar con 5 mL de agua purificada y girar suavemente para disolver por completo el contenido. Dosificar en alícuotas de 0,4 mL y almacenar a –20 °C o menos. Se pueden obtener aproximadamente entre 90 y 100 pruebas por cada frasco de 5 mL. Este suero debe calentarse a 56 °C durante 30 min antes de su utilización.

FTA Sorbent: Rehidratar con 5 mL de agua purificada y girar suavemente para disolver por completo el contenido. Almacenar a 2 – 8 °C o tomar una alícuota y almacenar a –20 °C. La cantidad de FTA Sorbent utilizada para cada muestra o suero de muestra es de 0,2 mL. La cantidad de FTA Sorbent necesaria para 3 controles es de 0,6 mL. Pueden realizarse aproximadamente entre 20 y 25 pruebas con 5 mL de FTA Sorbent.

FTA Sorbent Control: Rehidratar con 0,5 mL de agua purificada y girar suavemente para disolver por completo el contenido. Dosificar en alícuotas de 0,25 mL y almacenar a –20 °C o menos. Para cada prueba, se necesita 0,1 mL de FTA Sorbent Control. Se pueden realizar aproximadamente 2 pruebas por cada frasco de 0,5 mL debido a la evaporación al calentar. Este suero debe calentarse a 56 °C durante 30 min antes de su utilización.

FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit): Rehidratar con 1 mL o 5 mL de agua purificada, según las instrucciones de la etiqueta. Dosificar en alícuotas de 0,5 mL y almacenar a –20 °C o menos. Cada lote se suministra con una valoración de dilución. Dado que son diferentes las condiciones y el equipo de un laboratorio a otro, es necesario valorar y analizar un lote nuevo de conjugado con el microscopio de fluorescencia que se utilice actualmente[3,4,11].

1. Preparar diluciones seriadas en Tween 80 al 2%, incluida la valoración especificada en el vial.
2. Analizar cada dilución según el Procedimiento de análisis con el suero de control reactivo (4+) y el control de tinción no específico.
3. Analizar un lote conocido de conjugado con el suero de control reactivo (4+), el suero de control mínimamente reactivo (1+) y el control de tinción no específico como controles de los reactivos y las condiciones de la prueba.
4. La dilución que debe utilizarse en la prueba es la que produce una dilución doble inferior al criterio de valoración 4+. El criterio de valoración 4+ es la dilución más elevada de conjugado que produce una fluorescencia de 4+ con el suero de control reactivo (4+).

FA Buffer, Dried: Disolver 10 g en 1 litro de agua purificada y girar suavemente para disolver por completo el contenido. Almacenar a 2 – 8 °C. Utilizar la solución si no presenta moho ni turbidez.

Tween 80: Calentar el frasco de Tween 80 y un matraz con 98 mL de FA Buffer a 56 °C en baño María. Añadir 2 mL de Tween 80 al tampón y enjuagar bien la pipeta en el tampón. Comprobar el pH y ajustar a un pH de 7,2 con NaOH 1N. Desechar si muestra precipitado o se modifica el pH.

Procedimiento de análisis

Este procedimiento coincide con los publicados por la American Public Health Association[6,11].

1. **Frotis de FTA Antiqen:** Obtener frotis preparados con anterioridad, descongelar y secarlos (si procede) e identificar el extremo esmerilado de los portaobjetos para que correspondan con cada suero de prueba y de control que se analice.
2. Preparar los siguientes sueros de prueba y de control en tubos identificados apropiadamente no más de 30 min antes de realizar el análisis y mezclar bien (al menos 8 veces):

   Suero de prueba (1:5): Diluir 0,05 mL de suero de prueba calentado (o recalentado) en 0,2 mL de FTA Sorbent.

   Suero de control reactivo (4+) – Sin absorber: Diluir 0,05 mL de FTA Serum Reactive en 0,2 mL de FA Buffer (PBS).

   Suero de control reactivo (4+) – Absorbido: Diluir 0,05 mL de FTA Serum Reactive en 0,2 mL de FTA Sorbent.

   Suero de control mínimamente reactivo (1+): Diluir FTA Serum Reactive, como se indica en la etiqueta, en FA Buffer (PBS) hasta producir una fluorescencia de 1+. El nivel mínimo de fluorescencia que puede informarse como reactivo es 1+.

   Suero de control no reactivo (N) (1:40): Preparar una dilución de 1:40 de FTA Serum Non-Reactive añadiendo 0,05 mL (50 µL) de suero a 1,95 mL de FA Buffer (PBS).

   Control de suero no específico – Sin absorber (≥ 2+ de reactividad no específica): Diluir 0,05 mL de FTA Sorbent Control en 0,2 mL de FA Buffer (PBS).

   Control de suero no específico – Absorbido (no reactivo, – a ±): Diluir 0,05 mL de FTA Sorbent Control en 0,2 mL de FTA Sorbent.

   Control de tinción no específico – Sin absorber Utilizar 0,03 mL de FA Buffer (PBS) sin diluir.

   Control de tinción no específico – Absorbido: Utilizar 0,03 mL de FTA Sorbent sin diluir.
3. **Frotis de FTA Antigen:** Cubrir el frotis de FTA Antigen previamente identificado con 0,03 mL del suero de prueba o de control correspondiente antes preparado, asegurándose de que se cubra la totalidad del frotis.
4. Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda para evitar la evaporación e incubar a 35 – 37 °C durante 30 min.
5. Colocar los portaobjetos en un soporte deslizante y enjuagar de la manera siguiente:
   - Enjuagar en FA Buffer durante 5 sec.
   - Remojar en FA Buffer durante 5 min.
   - Agitar insertando y extrayendo del tampón 30 veces.
   - Volver a remojar y agitar en un tampón nuevo.
   - Enjuagar en agua destilada corriente durante 5 sec.
   - Secar suavemente con papel absorbente.
6. **FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit):** Diluir el conjugado a su valoración de trabajo (determinada anteriormente) con Tween 80 al 2% en FA Buffer.
7. **Frotis de FTA Antigen:** Cubrir cada frotis de prueba y de control con aproximadamente 0,03 mL de FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit) diluida. Esparcir uniformemente hasta cubrir todo el frotis.
8. Repetir los pasos 4 y 5.
9. Preparar los portaobjetos de inmediato con una pequeña gota de FA Mounting Fluid pH 7.2 y aplicar un cubreobjetos, teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire en el líquido de preparación.
10. Examinar inmediatamente los portaobjetos al microscopio para determinar la intensidad de la fluorescencia con el microscopio antes descrito. Si es necesario demorar la lectura, almacenar los portaobjetos en un lugar oscuro y efectuar la lectura dentro de las 4 h. Los resultados son válidos sólo si el resultado del control de calidad es satisfactorio.
11. Verificar la presencia de treponemas en los portaobjetos de control no reactivo mediante microscopia de campo oscuro.

Control de calidad del usuario

Rehidratar y diluir los reactivos según las instrucciones anteriores. Realizar la prueba según lo descrito. Las pruebas que no presenten los siguientes resultados de control no son satisfactorias y no deben informarse[4,11].

Suero analizado	Fluorescencia prevista	Interpretación
Suero de control reactivo – Sin absorber	4+	Reactivo
Suero de control reactivo – Absorbido	3+ a 4+	Reactivo
Suero de control mínimamente reactivo	1+	Reactivo
Suero de control no reactivo	N	No Reactivo
Control de suero no específico – Sin absorber	2+ a 4+	Reactivo
Control de suero no específico – Absorbido	N a ±	No Reactivo
Control de tinción no específico – Sin absorber	N	No Reactivo
Control de tinción no específico – Absorber	N	No Reactivo

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de NCCLS y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

Con el control de suero 1+ como norma de lectura, registrar la intensidad de fluorescencia de las treponemas e informar de la manera siguiente. Repetir la prueba de todas las muestras con una fluorescencia de prueba inicial de 1+.

Intensidad de la fluorescencia	Prueba inicial	Repetir prueba	Informe
De moderada a fuerte	2+ a 4+	NC	Reactivo
Equivalente al control 1+	1+	>1+	Reactivo
	1+	1+	Mínimamente reactivo*
	1+	<1+	No Reactivo
Tinción visible pero <1+	± a <1+	NC	No Reactivo
Ninguna o muy poco visible, no definida	–	NC	No Reactivo
Con aspecto "apolillado" o de "cuentas"			Atípica†

*Resultado dudoso.

† Se ha descrito la forma atípica o de cuentas de la fluorescencia en pacientes con lupus u otras enfermedades autoinmunes[11].

Las muestras con una lectura inicial de 1+ y una lectura de 1+ o más al repetirse la prueba se informan como reactivas. Los demás resultados se informan como no reactivos.

No es necesario repetir la prueba de las muestras no reactivas.

Sin evidencia clínica o de historial de infección treponémica, los resultados de prueba dudosos (véase la tabla) sugieren la necesidad de analizar una segunda muestra obtenida entre 1 y 2 semanas después de la muestra inicial.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Cuando se presenta una discrepancia entre los resultados de la prueba treponémica y la opinión clínica, repetir la prueba treponémica y obtener información clínica y de historial adicional. Si persiste la discrepancia, enviar la muestra a un laboratorio de referencia, tal como la autoridad local de salud pública, para realizar pruebas de confirmación adicionales. El diagnóstico final depende de la opinión clínica de un especialista con mucha experiencia en enfermedades de transmisión sexual[2,3].
2. La prueba no debe utilizarse para realizar un seguimiento de la respuesta al tratamiento ni se puede confiar en la misma para detectar casos nuevos no tratados en investigaciones epidemiológicas.
3. La fluorescencia "atípica" y los resultados positivos falsos se han asociado con pacientes con variedades activas sistémicas, discoides e inducidas farmacológicamente de lupus eritematoso[12-15] y otras enfermedades autoinmunes.
4. Los pacientes ancianos pueden presentar reacciones a FTA-ABS inexplicables.
5. De vez en cuando puede ser difícil decidir si una lectura es débil o muy poco visible. La capacidad de realizar esta distinción es clave, ya que no se repite la prueba de un suero no reactivo (muy poco o no visible).
6. La prueba FTA-ABS puede ser reactiva en personas de regiones en las que yaws o pinta son endémicas.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO[16]

Se comparó el rendimiento de la prueba FTA-ABS con la de la prueba ELISA, la prueba VDRL en portaobjetos y la prueba MHA-TP en un estudio realizado por Pope, Hunter y Feeley[16] en los Centers for Disease Control en Atlanta, Georgia, EE.UU. Se analizaron 297 sueros mediante un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), una prueba VDRL en portaobjetos, una prueba FTA-ABS y el análisis de microhemaglutinación para anticuerpos de *T. pallidum* (MHA-TP). La tabla 1 siguiente muestra una comparación de reactividad analítica por categorías de enfermedad al analizar 75 sueros de personas con sífilis y 222 sueros de personas sin sífilis[16].

Tabla 1

Categoría	Cant. Analizada	Cant. con reactividad a: FTA-ABS	ELISA	MHA-TP	VDRL
Sífilis primaria					
Sin tratar	22	22	17	9	17
Tratada	2	2	1	2	1
Sífilis secundaria					
Sin tratar	8	8	8	6	8
Tratada	12	12	12	12	12
Sífilis latente					
Sin tratar	13	13	12	12	10
Tratada	10	10	10	9	9
Tratamiento desconocido	1	1	1	1	1
Latente dudoso	3	3	3	3	0
Neurosífilis	3	3	2	2	0
Sífilis cardiovascular	1	1	1	1	0
Ausencia de sífilis					
Supuestamente normal	178	1	1	1	0
Positivo falso biológico	15	1	0	0	7
Enfermedades distintas de sífilis	29	1	1	0	1

La tabla 2 siguiente enumera los niveles de sensibilidad y especificidad de cada método publicado en este estudio[16].

Tabla 2

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
FTA-ABS	100%	97,8%
ELISA	89,3%	98,5%
MHA-TP	76%	98,2%
VDRL	93,3%	92,7%

DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
223441	**Difco** FTA Antigen, 1 mL
224401	**Difco** FTA Serum Non-Reactive, 5 mL
224391	**Difco** FTA Serum Reactive, 5 mL
232591	**Difco** FTA Sorbent, 5 mL
232592	**Difco** FTA Sorbent, 6 x 5 mL
232661	**Difco** FTA Sorbent Control, 6 x 0.5 mL
223143	**Difco** FA Buffer, Dried, 6 x 10 g
223142	**Difco** FA Buffer, Dried, 100 g
224491	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 1 mL
224492	**Difco** FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit), 5 mL
223291	**Difco** FA Mounting Fluid pH 7,2, 6 x 5 mL
231181	**Difco** Tween 80, 100 g

REFERENCIAS: Ver "References" en el texto en inglés.

Procedimiento de análisis de FTA-ABS — **Esquema abreviado**

Paso 1.	Paso 2.	Paso 3.	Paso 4.	Paso 5.
Preparar los sueros y los reactivos.	Diluir los sueros.	Añadir suero de prueba/ control a los frotis de FTA Antigen correspondientes.	Añadir conjugado a los frotis de FTA Antigen.	Registrar las reacciones de los sueros de prueba y de control. Verificar que los sueros de control suministraron los resultados previstos.

FTA Antigen	Frotis de FTA Antigen
Rehidratar con 1 mL de agua purificada. Preparar los frotis. Fijar con acetona. Utilizar como "frotis de FTA Antigen".	Descongelar, secar e identificar los frotis de FTA Antigen suficientes para lograr correspondencia con cada uno de los sueros de prueba y de control que se analicen.

Suero de prueba (paciente)				
Calentar a 56 °C durante 30 min o recalentar el suero anteriormente calentado durante 10 min.	Realizar una dilución de 1:5 añadiendo 0,05 mL de suero a 0,2 mL de FTA Sorbent.	Aplicar 0,03 mL de suero de prueba a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	Según el estado de los anticuerpos o el suero de prueba.
FTA Serum Reactive	**Suero de control reactivo (4+) - Sin absorber**			
Rehidratar con 5 mL de agua purificada. Calentar a 56 °C durante 30 min.	Realizar una dilución de 1:5 añadiendo 0,05 mL de FTA Serum Reactive a 0,2 mL de FA Buffer.	Aplicar 0,03 mL de Suero de control reactivo – Sin absorber a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	4+ reactivo
	Suero de control reactivo (4+) – Absorbido			
	Realizar una dilución de 1:5 añadiendo 0,05 mL de FTA Serum Reactive a 0,2 mL de FTA Sorbent.	Aplicar 0,03 mL de Suero de control reactivo – Absorbido a un frotis de FTA Antigen. Incubar y preparar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	3+ a 4+ reactivo
	Suero de control mínimamente reactivo (1+)			
	Diluir FTA Serum Reactive a 1+ de fluorescencia (valoración indicada en la etiqueta) en FA Buffer.	Aplicar 0,03 mL de suero de control mínimamente reactivo a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	1+ reactivo
FTA Serum Non-Reactive	**Suero de control no reactivo**			
Rehidratar con 5 mL de agua purificada. Calentar a 56 °C durante 30 min.	Realizar una dilución de 1:40 añadiendo 0,05 mL de FTA Serum Non-Reactive a 1,95 mL de FA Buffer.	Aplicar 0,03 mL de suero de control no reactivo a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	N - No reactivo
FTA Sorbent Control	**Control de suero no específico - Sin absorber**			
Rehidratar con 0,5 mL de agua purificada. Calentar a 56 °C durante 30 min.	Realizar una dilución de 1:5 añadiendo 0,05 mL de FTA Sorbent Control a 0,2 mL de FA Sorbent.	Aplicar 0,03 mL de Control de suero no específico – Sin absorber a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	2+ a 4+ reactivo
	Control de suero no específico – Absorbido			
	Realizar una dilución de 1:5 añadiendo 0,05 mL de FTA Sorbent Control a 0,2 mL de FA Sorbent.	Aplicar 0,03 mL de Control de suero no específico – Absorbido a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	N a ± no reactivo
FA Buffer, Dried	**Control de suero no específico - Sin absorber**			
Disolver 10 g en 1 L de agua purificada.	Utilizar 0,03 mL de FA Buffer sin diluir como diluyente (anterior) y como el Control de tinción no específico – Sin absorber.	Aplicar 0,03 mL de Control de tinción no específico – Sin absorber a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	N – No reactivo
FTA Sorbent	**Control de tinción no específico - Absorbido:**			
Rehidratar con 5 mL de agua purificada.	Utilizar 0,03 mL de FTA Sorbent sin diluir como el diluyente (anterior) y como el Control de tinción no específico – Absorbido.	Aplicar 0,03 mL de Control de tinción no específico – Absorbido a un frotis de FTA Antigen. Incubar el frotis. Enjuagar.	Aplicar 0,03 mL de conjugado al frotis. Incubar, enjuagar y preparar en portaobjetos. Examinar al microscopio.	N – No reactivo

FA Human Globulin Antiglobulin (Rabbit)	
Rehidratar con 1 mL o 5 mL de agua purificada. Determinar la valoración si se trata de un lote nuevo.	Diluir a la valoración indicada en la etiqueta con Tween al 2%. Utilizar como "Conjugado".

Tween 80
Calentar Tween 80 y FA Buffer a 56 °C. Añadir 2 mL de Tween 80 a 98 mL de FA Buffer. Ajustar a un pH de 7,2. Utilizar como "Tween al 2%".

Manufacturer / Producent / Fabrikant / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Ditta produttrice / Fabrikant / Fabricante / Tillverkare

Use by / Anvendes før / Houdbaar tot / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηία λήξης / Usare entro / Brukes før / Utilizar em / Usar antes de / Använd före /
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af måned) /
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä)
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutten av måneden)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden)

Catalog number / Katalognummer / Catalogusnummer / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Numero di catalogo / Katalognummer / Número do catálogo / Número de catálogo / Katalognummer

Authorized Representative in the European Community / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Autorisert representant i EU / Representante autorizado na União Europeia / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU

In Vitro Diagnostic Medical Device / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaite / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik

Temperature limitation / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Temperatura limite / Temperaturbegrensning / Limitação da temperatura / Limitación de temperatura / Temperaturbegränsning

Batch Code (Lot) / Batch kode (Lot) / Chargenummer (lot) / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Codice del lotto (partita) / Batch-kode (Serie) / Código do lote (Lote) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti)

Consult Instructions for Use / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultare le istruzioni per l'uso / Se i bruksanvisningen / Consulte as instruções de utilização / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen

Keep away from light / Må ikke udsættes for lys / Weghoudvan licht / Suojattava valolta / Conserver à l'abri de la lumière / Vor Licht schützen / Φυλάξτε το μακριά από το φως / Tenere al riparo dalla luce / Må ikke utsettes for lys / Manter ao abrigo da luz / Mantener alejado de la luz / Får ej utsättas för ljus

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

EC REP **BENEX Limited**
Bay K 1 a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46