



INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE  
PENTRU MICROBIOLOGIE ȘI IMUNOLOGIE  
„CANTACUZINO”

Splaiul Independenței 103, București, 050096

LABORATORUL NAȚIONAL DE REFERINȚĂ PENTRU ITS

	Elaborat	Verificat	Aprobat
Functia	Sef laborator	Sef laborator	Director LNR
Nume prenume	Dr. Dan Ionescu		
Semnatura*			
Data			

\* Semnatura se aplică pe documentul original

## PROCEDURA SPECIFICĂ

### DETECTAREA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI PRIN REACTIA DE IMUNOFLOURESCENȚA CU TRUSA FTA-ABS

**Cod:**

**Editia :**

**Revizia :**

**Data aplicării :**

**Avertisment** Documentul de față este proprietatea I.N.C.D.M.I. « CANTACUZINO »  
Reproducerea și difuzarea documentului sunt în exclusivitate dreptul I.N.C.D.M.I. «CANTACUZINO»  
Copiile sunt numerotate și controlate.

Exemplar nr : \_\_\_\_\_

Destinatarul: \_\_\_\_\_

Exemplar :  controlat  necontrolat



<b>I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS</b>	<b>PROCEDURA SPECIFICA DETECTAREEA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI PRIN REACTIA DE IMUNOFLUORESCENTA CU TRUSA FTA-ABS cod :</b>	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

## CUPRINS

INDICATORUL APROBARILOR SI REVIZIILOR .....	2
CUPRINS .....	3
1. SCOP .....	4
2. DOMENIUL DE APLICARE .....	4
3. DOCUMENTE DE REFERINTA .....	4
4. DEFINITII SI PRESCURTARI .....	4
4.1. Definitii .....	4
4.2. Prescurtari .....	4
5. DESCRIEREA ACTIVITATII .....	5
5.2. Precautii necesare in timpul lucrului .....	5
5.3. Resurse necesare .....	5
5.3.1. Reactivi , materiale furnizate de trusa: .....	5
5.4.1. Etape preliminare .....	6
5.4.2. Pregatirea probelor pentru testare .....	6
5.4.3. Etapele testarii .....	6
5.5. Validarea testului/ controlul calitatii rezultatelor .....	7
5.6. Interpretarea rezultatelor .....	7
5.7. Limitele testului .....	7
6. RESPONSABILITATI .....	8
7. INREGISTRARI/DOCUMENTE CONEXE .....	8
8. Anexe .....	8

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICA DETECTAREA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI PRIN REACTIA DE IMUNOFLUORESCENTA CU TRUSA FTA-ABS cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

## 1. SCOP

Procedura descrie operatiunile necesare efectuării testului FTA-Abs in scopul determinării calitative a prezentei anticorpilor antitreponemici in probe biologice.

### Principiul testului :

Probele de ser și/sau LCR de la pacienți se tratează inițial cu un sorbent, care conține antigene treponemice de grup, comune treponemelor patogene și comensale.

Probele de ser și/sau LCR absorbite și martorii de test corespunzători se depun pe spoturile cu *T.pallidum*.. Dacă în ser/LCR se găsesc anticorpi specifici, aceștia se vor lega de treponemele fixate formând complexe antigen-anticorp. După îndepărtarea materialului nelegat prin spălări repetate, anticorpii legați se detectează prin incubare cu un conjugat fluorescent anti Ig umane. După îndepărtarea conjugatului nelegat de complexe antigen-anticorp prin noi spălări, lamele se examinează la microscopul cu sursa de lumina ultravioleta (UV).

Reacția pozitivă = treponeme fluorescente, galben verzui.

## 2. DOMENIUL DE APLICARE

Procedura se aplica pentru confirmarea, in toate fazele evolutive, a diagnosticului serologic al sifilisului la adult si nou nascut

Testul se execută de către personalul autorizat din **I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO** în Laboratorul ITS.

## 3. DOCUMENTE DE REFERINTA

- 3.1. Procedura generala "Ghid pentru elaborarea procedurilor" (PG-EM-01) –
- 3.2. Bench-level Laboratory Manual for Sexually Transmitted Diseases WHO/VDT/89.443
- 3.3. A Manual of Tests for Syphilis, 9<sup>th</sup> edition, ed. By S.A. Larsen et al., 1998
- 3.4. Ghid de Diagnostic si Tratament al Infectiilor Transmise Sexual, MSF 2004, Bucuresti
- 3.5. Prospectul utilizatorului redactat de către producător:

## 4. DEFINITII SI PRESCURTARI

### 4.1. Definitii

Fluorescenta = fenomenul fizic prin care o substanta (fluorocrom) absoarbe energie luminoasa cu lungime de unda scurta (excitare) si emite energie luminoasa vizibila cu lungime de unda lunga.

Fluorocromul cel mai des folosit in testele clinice de imunofluorescenta este isothiocyanatul de fluoresceina (FITC) care :

- emite lumina fluorescenta cu eficienta mare - 525nm-verde galbui fata de care ochiul are o mare sensibilitate,
- se leaga (conjugare) cu usurinta si stabil de anticorpi (pe regiunea Fc) , neinterferând cu capacitatea de legare specifica a acestuia

Citirea reactiei se face la un microscop (transmisie sau epi-iluminare) special echipat, cu sursa de lumina ultravioleta si filtre corespunzatoare (495 și 510nm).

Imunofluorescenta indirectă este o metodă de testare serologică in doi timpi ,incubarea cu ser a lamelor cu antigen, urmata de incubarea cu conjugatul fluorescent, pentru detectarea anticorpilor în serul de testat

### 4.2. Prescurtari

FITC = isothiocyanat de fluoresceină

FTA-Abs =Fluorescent Treponemal Antibody with Absorbtion

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICA DETECTAREA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI PRIN REACTIA DE IMUNOFLOURESCENTA CU TRUSA FTA-ABS cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

TFS/PBS = Tampon Fosfat Salin /Phosphate Buffered Saline  
ID/SN = numar de identificare/numar de serie

## 5. DESCRIEREA ACTIVITATII

### 5.1 Conditii prealabile

- Temperatura camerei de lucru trebuie sa fie de + 23+29°C.
- Fiecare lot nou de truse/antigen se evalueaza comparativ cu lotul anterior.
- Aparatele si dispozitivele necesare executarii procedurii trebuie sa fie in stare de buna functionare.
- Probele de testat trebuie sa corespunda din punct de vedere cantitativ (min. 0.5ml) si calitativ. Nu se testeaza probe de ser/LCR pastrate mai mult de 72h la + 2+8°C, seruri hemolizate, lipemice, contaminate bacterian/fungic sau LCR contaminat cu sange.
- Personalul desemnat sa execute testarile trebuie sa aiba calificarea/experienta necesara.

### 5.2. Precautii necesare in timpul lucrului

In afara de precautiile obisnuite pentru lucru cu material potential infectios, trebuie avut grija ca:

- spoturile cu antigen de pe lame sa nu se usuze complet intre spalari si incubari, ci numai spatiile dintre ele
- in timpul si dupa incubarea cu conjugat, lamele se tin la intuneric (acoperite cu hartie neagra)
- spoturile cu antigen trebuiesc acoperite complet cu dilutia de ser ser / conjugat
- serurile / conjugatul nu trebuie sa migreze dincolo de conturul spotului
- lama nu se atinge cu conul de prelevare in timpul repartizariiserurilor / conjugatului

### 5.3. Resurse necesare

#### 5.3.1. Reactivi , materiale furnizate de trusa:

Lame de microscop cu 12 spoturi pe care sunt fixate *T. Pallidum*, ambalate individual în plicuri cu silicagel.

Ser uman, martor pozitiv

Ser uman, martor negativ

Conjugat FITC (conjugat fluorescent anti-IgG de om)

Tampon de dilutie (probe, sorbent)

Tween 20 pentru PBS

PBS, praf (se dizolvă în 1L AD si se adauga 25 picaturi de Tween 20 se pastreaza la +4°C)

Mediu de montaj

Ultrasorbent = un flacon cu extract liofilizat de cultură T.Reiter. Se reconstituie cu 5ml tampon de dilutie si se pastreaza la +4-+8°C, pana la data expirarii.

#### 5.3.2. Materiale necesare, nefurnizate de trusa :

Apa distilata

Pipete de sticla de 5-10 ml

Camera umeda cu stativ pentru lame (placa Petri cu diametrul de 20cm cu capac, captusita cu hartie de filtru umezita)

Anse bacteriologice de unica folosinta

Lamele ( 25mmx60mm )

Flacon pentru tamponul de spalare (piseta)

Hartie de filtru

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICA</b> <b>DETECTAREA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI</b> <b>PRIN REACTIA DE IMUNOFLUORESCENTA CU</b> <b>TRUSA FTA-ABS</b> cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

Manusi latex

Container cu detergent/dezinfectant (hipoclorit de sodiu 0.5-1%) pentru pipetele de sticla si conurile de prelevare utilizate

### 5.3.3. Echipamente/dispozitive

- Microscop binocular echipat pentru fluorescenta , cu filtre pentru FITC
  - obiectiv uscat 40x, ocular 10x,
  - condensator cu fond intunecat ( necesar la microscopul cu transmisie)
- Centrifuga de masa , pentru centrifugarea probelor daca este cazul
- Pipeta automata 20-200µl , conuri de prelevare galbene, de unica folosinta
- Ceas semnalizator

### 5.4. Executia testului

Testul se execută calitativ, pe probe de ser, plasma sau LCR.

Executia operatiunilor in succesiunea lor, schema de lucru, rezultatul verificarilor si calculele necesare se inregistreaza in Fisa de lucru Cod .:

#### 5.4.1. Etape preliminare

- Se pregateste spatiul de lucru pentru executarea procedurii și asigurarea măsurilor de biosiguranta:  
Se elibereaza locul de obiectele care nu sunt necesare,  
Se aduc stative potrivite, hartie de filtru, vasul cu dezinfectant pentru conurile de prelevare folosite
- Se scot reactivii, probele, din frigider (+2+8°C) / congelator (- 20°C) si se lasa in repaos pe masa de lucru 30min.
- Se verifica functionarea echipamentelor; se verifica reglajul microscopului
- Se completeaza schema de lucru in Fisa de lucru si se inscripioneaza corespunzator tuburile necesare pentru dilutiile de seruri martor si probe.

#### 5.4.2. Pregatirea probelor pentru testare

- Se contoleaza aspectul probelor si, daca este nevoie, se clarifica prin centrifugare (5min 1200rpm)

#### 5.4.3. Etapele testarii

- Se dilueaza 1/5, martorul pozitiv si cel negativ in tampon de dilutie si sorbent (100µl PBS/sorbent + 25µl ser pozitiv )
- Se dilueaza in sorbent probele de testat :
  - 1/5 probele de ser (100µl sorbent + 25µl ser) sau
  - 1/3 probele de LCR (40µl sorbent + 20µl LCR )
- Se scot lamele cu antigen din plicuri si se aseaza pe stativ in placa Petri (camera umeda)
- Se repartizeaza cate aprox 10µl / spot dilutiile de martori si probe cf. schemei de lucru; pe spoturile corespunzatoare se repartizeaza, 10µl / spot, diluent si PBS.
- Se acopera placa Petri cu capac si se incubeaza 30min., pe masa .
- Se spala cu PBS, 3 x 5min. : lama se tine usor inclinata iar jetul de lichid se directioneaza pe mijlocul lamei intre sirurile de spoturi, dupa care se pune pe stativ acoperita cu PBS pentru cate 5 min.
- Dupa ultima spalare lama se clateste scurt (5-10sec.) cu un jet de apa distilata si se pune la scurs pe hartie de filtru.
- Se repartizeaza pe toate spoturile dilutia de conjugat, se acopera camera umeda cu capac si se incubeaza la intuneric 30 min.,temp. camerei.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICA</b> <b>DETECTAREA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI</b> <b>PRIN REACTIA DE IMUNOFLOURESCENTA CU</b> <b>TRUSA FTA-ABS</b> cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

- Se repeta ciclul de 3x5min. spalari, in aceleasi conditii ca mai sus, se clateste lama cu apa distilata si se pune la scurs si uscat pe hartie de filtru.
- Lama se acopera cu lamela ( $\pm$  lichid de montaj) si se examineaza la microscop (la intuneric).
- Inainte de citirea la lumina UV, spoturile se examineaza la lumina alba cu condensator de camp intunecat pentru a verifica prezenta treponemelor pe spoturi.
- Rezultatele testului se apreciaza conform 5.4.4 si 5.5. Inregistrarea rezultatelor se face in Fisa de inregistrare Cod :

#### 5.4.4. Aprecierea rezultatelor

Citire	Intensitatea fluorescentei treponemelor
2+ - 4+	Moderata pana la puternica
1+	Minim reactiv (1+)
$\pm$	Vizibila dar mai slaba decat 1+
-	Lipseste

#### 5.5. Validarea testului/ controlul calitatii rezultatelor

**Validare** : înainte de citirea probelor se examinează martorii, primul fiind controlul minim reactiv (standardul de citire 1+). Dacă rezultatele citirii nu corespund rezultatelor din tabel, testul nu este valid.

Martor	Rezultat așteptat
Martor reactiv dil. in PBS	4+
Martor reactiv dil.in sorbent	3+... 4+
Martor nespecific dil in PBS	2+...4+
Martor nespecific + sorbent	-
Martor PBS	-
Martor sorbent	-

**Controlul calitatii testului** este asigurat de prezenta tuturor martorilor la testarile zilnice si executia corecta si documentata a tuturor etapelor de lucru din procedura.

#### 5.6. Interpretarea rezultatelor

Probele notate in urma examinarii cu 1+ pana la 4+ se considera probe **pozitive/reactive**

Probele cu fluorescanta palida, notate cu  $\pm$  , se considera la limita si se repeta pe alta proba.

Probele lipsite de fluorescanta sunt considerate probe **negative/nereactive**.

#### 5.7. Limitele testului

Testul poate da uneori rezultate fals pozitive (sarcină, lepră, SLE, etc.)

Testul s-a demonstrat a fi sensibil (este primul care devine pozitiv) și specific dar, pentru a fi considerate ca semnificative diagnostic, rezultatele trebuiesc considerate în contextul tuturor rezultatelor serologice (VDRL/RPR și TPHA), a istoricului clinic, tratament în antecedente etc.

În cazurile neurologice suspecte, LCR pozitiv certifică infecția activă dar, un rezultat negativ nu exclude neurosifilisul.

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	<b>PROCEDURA SPECIFICA</b> <b>DETECTAREEA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI</b> <b>PRIN REACTIA DE IMUNOFLUORESCENTA CU</b> <b>TRUSA FTA-ABS</b> cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

## 6. RESPONSABILITATI

Procedura este efectuată de către asistent medical.

Verificarea execuției procedurii, citirea, înregistrarea și interpretarea rezultatelor este efectuată de către șeful de laborator.

## 7. INREGISTRARI/DOCUMENTE CONEXE

### 8. Anexe

Anexa 1 – FIȘĂ LUCRU TEST FTA-Abs cod - F-PS-EM-04-01

Anexa 2 – FORMULAR INREGISTRARE REZULTATE TEST FTA-Abs cod - F-PS-EM-04-02



I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICA DETECTAREEA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI PRIN REACTIA DE IMUNOFLUORESCENTA CU TRUSA FTA-ABS cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

## ANEXA 1

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FIȘĂ DE LUCRU
	Nr.            din data de : TESTUL DE IMUNOFLORESCENTA FTA-Abs cod :

Tip probe de analizat : ser [ ]  
LCR [ ]

ID probe de analizat :

Echipamente : Microscop cu sursa UV :

Centrifuga:

Pipeta automata :

Termostat:

Temp. camera : °C

### Etape de lucru

1. Pregătirea postului de lucru [ ]
2. Reactivi trusa, probe repaos 30min. la temp. +20+25°C ora:
3. Verificarea functionarii echipamentelor si reglajul microscopului [ ]
4. Completarea schemei de lucru
5. Inscriptiunea tuburilor pentru dilutii cf. schemei [ ]
6. Diluția martori (M) / probe (P) [ ]

	PBS	Sorbent
M1 Ser reactiv    25μl	100μl	
M2 Ser reactiv    25μl		100μl
M3 Ser negativ    25μl	100μl	
M4 Ser negativ    25μl		100μl
P1- Proba ser       25μl		100μl
Proba LCR      20μl		40μl

7. Repartizare dilutii M/P pe spoturile lamei (10μl/spot) [ ]  
Repartizare cf. schemei cate 10μl PBS (M5) si respectiv sorbent (M6)
8. Incubare 30min. in camera umeda ora :
9. Spalari cu PBS 3x5min/ scurt apa distilata/scurgere ora :
- 10.Repartizare conjugat pe lama si incubare cf.pct. 8 ora :
11. Spalari cu PBS 3x5min/ scurt apa distilata/scurgere ora :
12. Citire rezultate  
Validarea testului DA [ ] NU [ ]
13. Înregistrarea datelor în Formular rezultate Nr..... [ ]

Executant:

Verificat, (functie, nume semnatura)

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	PROCEDURA SPECIFICA DETECTAREEA ANTICORPILOR ANTI TREPONEMICI PRIN REACTIA DE IMUNOFLORESCENTA CU TRUSA FTA-ABS cod :	Exemplar nr.
		Editia:
		Revizia:
		Data aplicării:

I.N.C.D.M.I. CANTACUZINO LNR ITS	FIȘĂ DE LUCRU Nr.            din data de : TESTUL DE IMUNOFLORESCENTA FTA-Abs cod :
--	--

**Schema de lucru**

**Lama I**

<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>
<b>ID P1</b>	<b>ID P2</b>	<b>ID P3</b>	<b>ID P4</b>	<b>ID P5</b>	<b>ID P6</b>

**Lama II**

<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>
<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>

**Lama III**

<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>
<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>	<b>ID P</b>

**M 1-6** = martori test cf. pct 6-7 Fisa de lucru pg.1

**ID P** = identitatea probelor testate

