Aula 2 Diagnóstico da sífilis

Testes para o diagnóstico da sífilis

Para o diagnóstico da sífilis podem-se utilizar os testes treponêmicos e os não treponêmicos. Neste etapa dos estudos você conhecerá mais sobre cada um deles e sua importância no diagnóstico das diferentes fases de evolução da sífilis.

Testes treponêmicos

São testes que detectam anticorpos contra antígenos do *Treponema pallidum*.

Estes testes são qualitativos. Eles definem a presença ou ausência de anticorpos na amostra.

Testes não treponêmicos

São testes que detectam anticorpos não treponêmicos, anteriormente denominados anticardiolipínicos, reagínicos ou lipoídicos. Esses anticorpos não são específicos para *Treponema pallidum*, porém estão presentes na sífilis. Os testes não treponêmicos podem ser:

- **qualitativos** – rotineiramente utilizados como testes de triagem para determinar se uma amostra é reagente ou não;
- **quantitativos** – são utilizados para determinar o título dos anticorpos presentes nas amostras que tiveram resultado reagente no teste qualitativo e para o monitoramento da resposta ao tratamento. O título é indicado pela última diluição da amostra que ainda apresenta reatividade ou floculação visível.

O fenômeno de prozona

Trata-se da ausência de reatividade em uma amostra que, embora contenha anticorpos não treponêmicos, apresenta resultado não reagente quando é testada sem diluir – ou mesmo em baixas diluições. Esse fenômeno decorre da relação desproporcional entre as quantidades de antígenos e anticorpos presentes na reação não treponêmica, gerando resultados falso-negativos. Ocorre nas amostras de pessoas com sífilis, em virtude da elevada quantidade de anticorpos presentes.

O fenômeno de prozona não é observado nos testes treponêmicos. É observado principalmente na sífilis secundária, fase em que há produção de grande quantidade de anticorpos. Além disso, o fenômeno é facilmente identificado fazendo-se o teste qualitativo com a amostra pura e diluída a 1:8 ou a 1:16.

Diferenças entre os testes não treponêmicos e os treponêmicos

A diferença principal é que os testes não treponêmicos detectam anticorpos que não são específicos contra *Treponema pallidum*, e os testes treponêmicos detectam anticorpos específicos para antígenos de *T. pallidum*. Podem ocorrer resultados falso-positivos em diferentes situações, tendendo a apresentar títulos baixos nos testes não treponêmicos.

Resultados falso-positivos podem ser **permanentes:**

- em portadores de lupus eritematoso sistêmico;
- na síndrome antifosfolipídica e em outras colagenoses;
- na hepatite crônica;
- em usuários de drogas ilícitas injetáveis;
- na hanseníase;
- na malária.

Resultados falso-positivos podem também ocorrer **transitoriamente:**

- em algumas infecções;
- após vacinações;
- no uso concomitante de medicamentos;
- após transfusões de hemoderivados;
- na gravidez;
- em idosos.

Testes não treponêmicos apresentam mais resultados falso-positivos que os testes treponêmicos. Cerca de 1% da população apresenta reatividade nos testes treponêmicos sem ter a infecção. No exame FTA-abs, as reações falso-positivas habitualmente apresentam os treponemas com um padrão atípico de fluorescência em forma de contas. Isso ocorre, por exemplo, na borreliose de Lyme. Neste caso, o FTA-abs é reagente e o VDRL geralmente é não reagente.

Técnicas utilizadas nos testes para o diagnóstico da sífilis

Apresentamos a seguir as diferentes metodologias utilizadas nos testes existentes para o diagnóstico da sífilis:

Pesquisa direta do *T. pallidum*:

Técnica	Testes
Microscopia	A fresco em campo escuro Coloração (Fontana-Tribondeaux ou Imunfluorescência Direta)

Quadro 1 – Técnicas para pesquisa do *T. pallidum*.

Nos testes não treponêmicos:

Técnica	Testes
Floculação	VDRL (*Venereal Disease Laboratory*) RPR (*Rapid Test Reagin*) USR (*Unheated Serum Reagin*) TRUST (*Toluidine Red Unheated Serum Test*)
Aglutinação	Testes Rápidos – TR
Imunoenzimáticos (ELISA)	ELISA (*Enzyme – linked immunossorbent assay*)
Imunocromatográficos	Testes Rápidos – TR

Quadro 2 – Técnicas para testes não treponêmicos.

Nos testes treponêmicos:

Técnica	Testes
Imunofluorescência indireta	FTA-abs (*Fluorescent treponemal antibody absorption*)
Hemaglutinação	MHA-TP (*microhemaglutinação para Treponema pallidum*)
Aglutinação de partículas	TPPA (*Treponema pallidum particle agglutination assay*)
Imunoenzimáticos e suas variações	ELISA (*Enzyme-linked immunossorbent assay*), CMIA (Ensaio imunológico quimioluminescente magnético)
Imunocromatografia	Testes rápidos
Testes moleculares	Reação de amplificação do DNA da bactéria como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Quadro 3 – Técnicas para testes treponêmicos.

Exames laboratoriais para o diagnóstico da sífilis primária

Esses exames são de dois tipos:

- Exame direto realizado com amostra coletada diretamente da lesão – exame de microscopia que permite a identificação de *Treponema pallidum*. A microscopia pode ser realizada para a pesquisa do treponema em campo escuro, após a coloração pelo método de Fontana-Tribondeaux ou pela imunofluorescência direta.
- Exames sorológicos – embora o tempo para o surgimento dos anticorpos possa variar de pessoa a pessoa, a partir de 10 dias da evolução do cancro duro é possível obter reatividade nos testes sorológicos. O FTA-abs é o primeiro teste a se tornar reagente na sífilis.

Teste não treponêmico de floculação e seus procedimentos

Você vai conhecer agora detalhes das metodologias dos testes não treponêmicos, seu funcionamento, suas indicações de uso e os cuidados necessários para obter resultados precisos e confiáveis.

Testes de floculação

Os testes de floculação baseiam-se em uma suspensão antigênica que contém cardiolipina, colesterol e lecitina.

No preparo da suspensão antigênica, a ligação desses componentes ocorre ao acaso e resulta na formação de estruturas arredondadas denominadas micelas, conforme você pode ver na figura adiante.

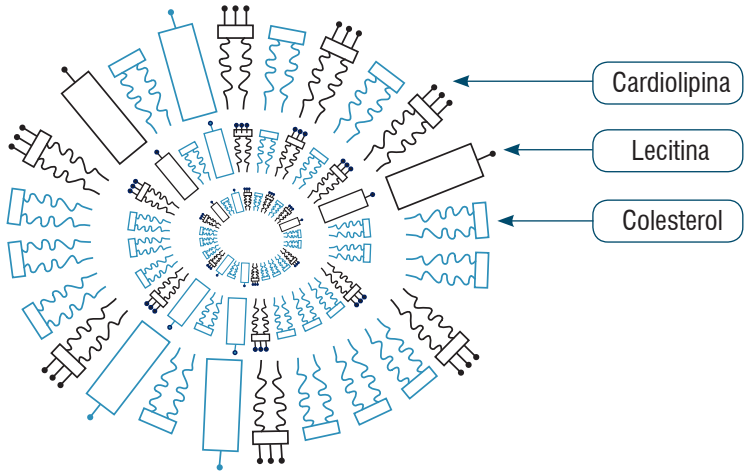


Figura 1 – Representação esquemática do antígeno dos testes não treponêmicos, na forma de micelas.

Os anticorpos não treponêmicos presentes na amostra ligam-se às **cardiolipinas**[1] das micelas.

A ligação de anticorpos em várias micelas resulta na floculação, que pode ser observada ao microscópio. Veja a figura a seguir, que representa a ligação de várias micelas por meio dos anticorpos.

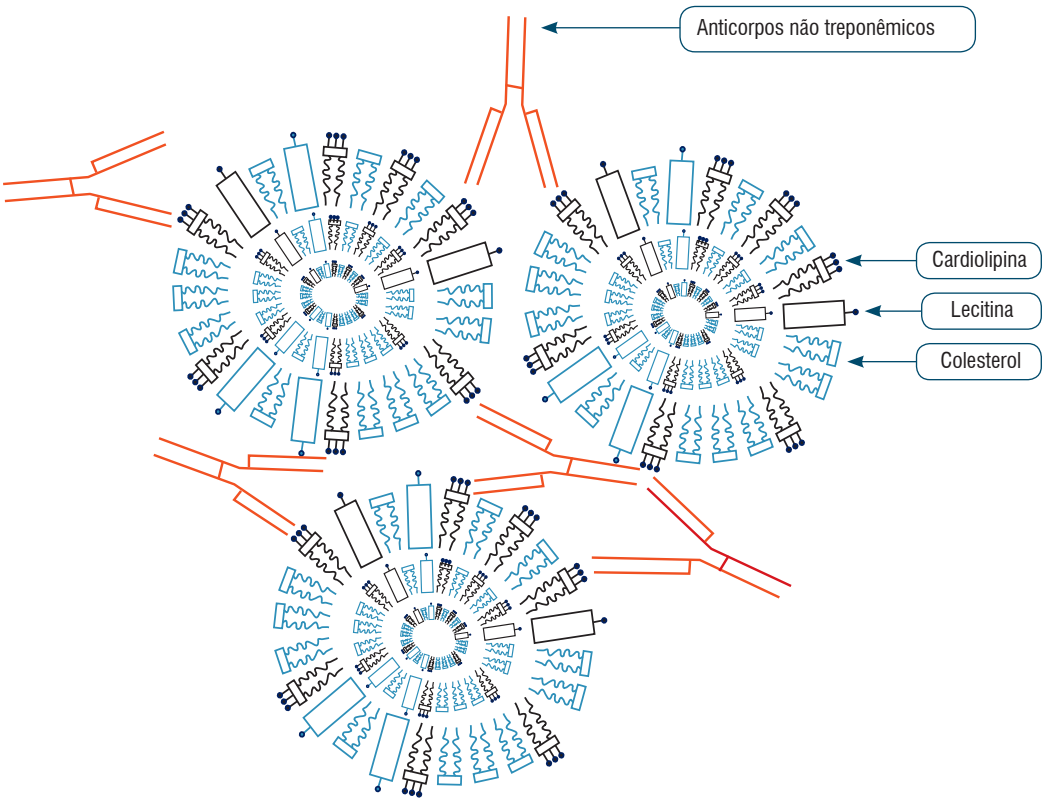


Figura 2 – Representação esquemática de uma reação de floculação na qual os anticorpos não treponêmicos ligam-se simultaneamente em várias micelas.

Essa ligação é encontrada na forma de flocos ou grumos, grandes ou pequenos, que podem ser visualizados a olho nu em alguns testes e em outros com auxílio de microscópio.

Veja na figura adiante algumas fotos da reação de VDRL observadas em microscópio óptico comum em aumento de 100 vezes.

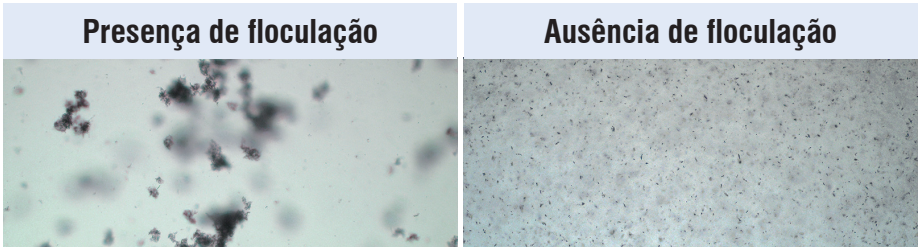


Figura 3 – Observação de floculação e da ausência de floculação na reação de VDRL.

Agora, confira o quadro a seguir, que expõe de modo sistematizado os testes de floculação e sua composição antigênica.

1 - cardiolipinas – são lipídios encontrados em baixas concentrações em tecidos de mamíferos. A cardiolipina sódica obtida de coração de boi é utilizada no preparo do antígeno VDRL.

Teste	Composição antigênica
VDRL (Venereal Disease Laboratory)	• cardiolipina (0,03%); • colesterol (0,9%); e • lecitina (0,21+/-0,1%).
RPR (Rapid Plasma Reagin)	• cardiolipina; • colesterol; • lecitina; • cloreto de colina para eliminar a necessidade de inativação da amostra; • EDTA para aumentar a estabilidade da suspensão antigênica; e carvão para permitir a leitura da reação a olho nu.
USR (Unheated Serum Reagin)	• cardiolipina; • colesterol; • lecitina; • cloreto de colina; • EDTA.
TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test)	• cardiolipina; • colesterol; • lecitina; • cloreto de colina; • EDTA; • corante vermelho de toluidina para permitir a leitura da reação a olho nu.

Quadro 4 – Testes de floculação e sua composição antigênica.

Observe no quadro a seguir, os tipos de amostras e as exigências de cada teste de floculação.

Características	Testes			
Tipo de amostra que pode ser utilizada	**VDRL**	**RPR**	**USR**	**TRUST**
Líquor	Sim	Não	Não	Não
Plasma	Não	Sim	Não	Sim
Soro	Sim	Sim	Sim	Sim
Exigências de cada teste	**VDRL**	**RPR**	**USR**	**TRUST**
O teste requer inativação da amostra	Sim	Não	Não	Não
Antígeno já está pronto para uso	Não	Sim	Sim	Sim
Leitura em microscópio	Sim	Não	Sim	Não
Leitura a olho nu	Não	Sim	Não	Sim
Teste qualitativo e quantitativo	Sim	Sim	Sim	Sim
Estabilidade da suspensão antigênica	8 horas	Meses	Meses	Meses

Quadro 4 – Tipos de amostras e as exigências de cada teste

Verifique a validade da suspensão antigênica e dos outros insumos em cada conjunto diagnóstico. Siga rigorosamente as instruções de cada fabricante.

Escolha do teste de floculação para diagnóstico da sífilis

A escolha do teste não treponêmico depende das características do seu serviço, como:

- o tipo de amostra a ser testada (líquor, soro ou plasma);
- equipamentos disponíveis (banho-maria, microscópio);
- tamanho da rotina.

Outro fator a ser considerado na hora de escolher é a **qualidade do teste**[2]. Antes de adquirir o conjunto diagnóstico para sífilis, certifique-se da qualidade do produto, solicitando ao fornecedor um *kit* para avaliar o desempenho.

O **VDRL** é o único teste de floculação que pode ser utilizado para a pesquisa de anticorpos não treponêmicos no **líquor**.

2 - Na aula 5 deste curso você encontrará informações de como realizar o controle de qualidade dos testes de floculação.

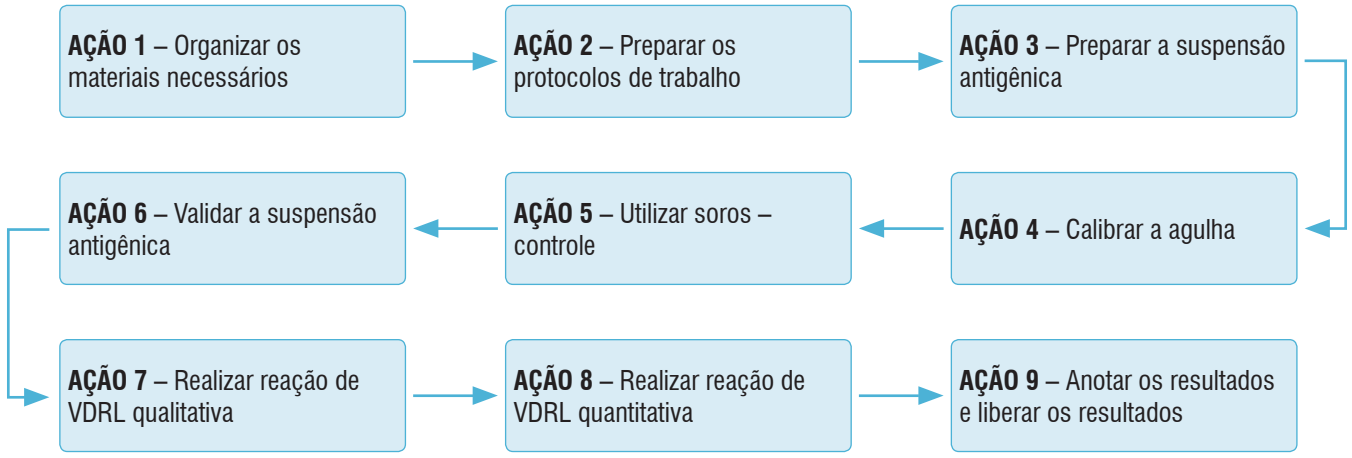
Reação de VDRL com amostra de soro

O VDRL é um teste não treponêmico muito utilizado no Brasil. Você conhecerá a partir de agora, em detalhes, a reação do VDRL feita com a suspensão antigênica preparada com base no antígeno concentrado para o teste em amostras de soro.

Antes de iniciar seu trabalho, você deve consultar os protocolos de **Procedimentos Operacionais Padrão (POP)**, que descrevem detalhadamente:

- os procedimentos a serem realizados para cada conjunto diagnóstico;
- as instruções de uso e os cuidados a serem adotados em cada equipamento que será utilizado;
- o passo a passo de ações para cada atividade.

Confira a seguir a sequência de nove ações recomendadas para você adotar em um teste VDRL, as quais serão detalhadas nos próximos tópicos desta aula.



Ação 1 – Organização dos materiais necessários para o teste de VDRL

Os materiais necessários para a realização do teste estão listados a seguir.

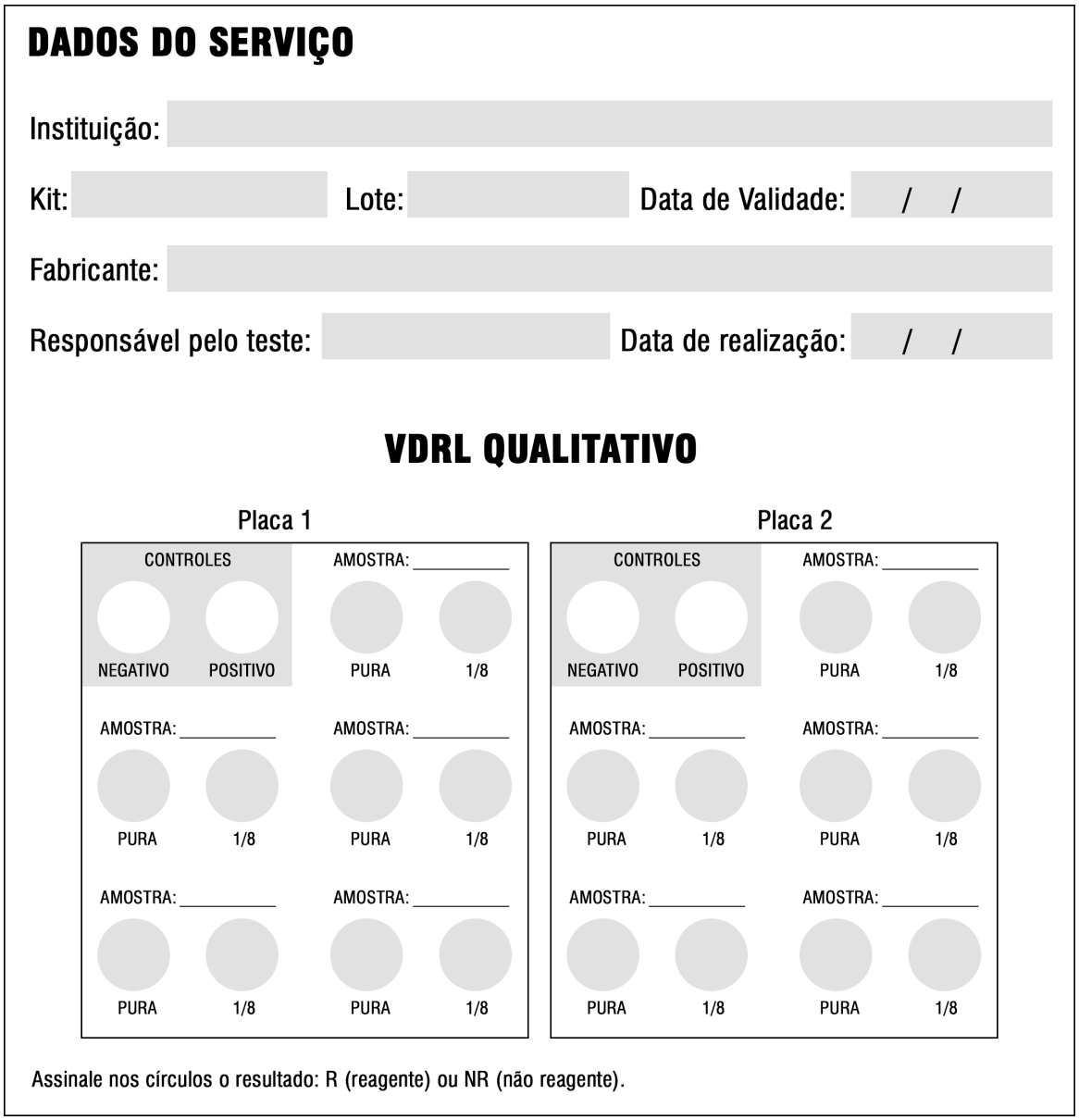
- Conjunto diagnóstico (kit) para VDRL.
- Solução salina (NaCl 0,9%).
- Soros controles: reagente com título conhecido e não reagente.
- Seringa de vidro de 1 mL ou 2 mL.
- Agulha calibrada para gotejar 17 μL ou pipeta para volume de 17 μL.
- Erlenmeyer de 25 mL com tampa de vidro esmerilhado.
- Lâminas de vidro planas, demarcadas com 12 círculos com 14 mm de diâmetro cada (lâminas de VDRL).
- Agitador orbital, tipo Kline, ajustado para 180 ± 2 rpm.
- Microscópio óptico comum (objetiva 10X e ocular 10X).
- Banho-maria a 56°C.
- Tubos de ensaio 12 X 75 mm, para as diluições em tubo.

> **!** Verifique sempre o nível de água do banho-maria e se a temperatura está em 56ºC.

- Pipetas de volume ajustável entre 50 μL e 200 μL.
- Ponteiras descartáveis para volumes entre 50 μL e 200 μL.
- Pipetas de vidro de 1 mL e 5 mL.
- Pera ou macrocontrolador de pipetagem para pipetas de vidro.
- Recipiente para descarte de ponteiras.
- Recipiente de vidro para descontaminação de produtos biológicos, contendo solução aquosa de hipoclorito de sódio (uma parte de água sanitária comercial mais quatro partes de água).
- Recipiente com água e sabão neutro para colocar as pipetas de vidro utilizadas.
- Recipiente com álcool 70% (peso a peso – p/p) para colocar as lâminas de VDRL utilizadas.
- Cronômetro.
- Caneta para escrever em vidro.
- Protocolo de trabalho.

Ação 2 – Preparar os protocolos de trabalho

Observe o modelo de protocolo de trabalho indicado a seguir.



DADOS DO SERVIÇO

Instituição:

Kit: Lote: Data de Validade: / /

Fabricante:

Responsável pelo teste: Data de realização: / /

VDRL QUALITATIVO

Placa 1

CONTROLES AMOSTRA: _____

NEGATIVO POSITIVO PURA 1/8

AMOSTRA: _____ AMOSTRA: _____

PURA 1/8 PURA 1/8

AMOSTRA: _____ AMOSTRA: _____

PURA 1/8 PURA 1/8

Placa 2

CONTROLES AMOSTRA: _____

NEGATIVO POSITIVO PURA 1/8

AMOSTRA: _____ AMOSTRA: _____

PURA 1/8 PURA 1/8

AMOSTRA: _____ AMOSTRA: _____

PURA 1/8 PURA 1/8

Assinale nos círculos o resultado: R (reagente) ou NR (não reagente).

Algumas ações são importantes na hora de preparar os protocolos de trabalho. Confira a seguir.

- Antes de iniciar seu trabalho diário, reveja o conteúdo dos POP e compare se está de acordo com as bulas.
- Faça as alterações sempre que o fabricante realizar modificações na bula.
- Observe se houve alteração dos procedimentos recomendados pelo fabricante para testes de diferentes lotes.
- Observe se os procedimentos variam quando o conjunto diagnóstico é utilizado com amostras diferentes, como VDRL no soro ou no líquor.
- Leia sempre as bulas e mantenha-as disponíveis para consulta.

Ação 3 – Preparar a suspensão antigênica de VDRL

O preparo da suspensão antigênica a partir do antígeno concentrado deve seguir as instruções do fabricante. Existe padronização internacional para esse teste. Este padrão é o que foi adotado nesse curso. Caso o kit que você dispõe defina uma orientação diferente dessa, siga o que foi definido pelo fabricante do produto que você dispõe.

Instruções para preparo da suspensão antigênica

1. Pipete 0,4 mL da salina tamponada pH 6,0 (que acompanha o *kit*) no fundo do Erlenmeyer. Use uma pipeta de vidro para volume até 1 mL.
2. Retire 0,5 mL do frasco do antígeno com uma pipeta de vidro para volume até 1 mL. Tampe o frasco para evitar evaporação.
3. Posicione a pipeta com o antígeno na porção superior do Erlenmeyer.
4. Adicione 0,5 mL do antígeno, gota a gota, diretamente sobre a salina.
5. Faça movimentos circulares, contínuos e suaves com o Erlenmeyer apoiado na bancada. Para obter a velocidade ideal de rotação, você deve, a cada segundo, dar três voltas com o Erlenmeyer, formando um círculo de aproximadamente 5 cm de diâmetro.
6. Certifique-se de que, ao final de 6 segundos, todo o antígeno esteja gotejado (inclusive a última gota).
7. Continue fazendo movimentos circulares por mais 10 segundos.
8. Adicione ao Erlenmeyer 4,1 mL da salina tamponada com uma pipeta de vidro para volume até 5 mL.
9. Tampe o Erlenmeyer e homogeneíze a suspensão fazendo movimentos suaves de inversão – aproximadamente 30 vezes.
10. Identifique a suspensão antigênica escrevendo no Erlenmeyer: Suspensão para VDRL, a data e a hora do preparo.



O antígeno concentrado está dissolvido em álcool. Se o frasco ficar aberto, ocorrerá sua evaporação e haverá mudança na concentração do antígeno.

A qualidade da reação de VDRL depende do preparo da suspensão antigênica.
Por isso, prepare sempre o volume de 5,0 mL de suspensão antigênica – seguindo o procedimento descrito no quadro passo a passo anterior –, mesmo que a quantidade de amostras a ser analisada seja pequena.

Se houver um grande número de amostras na sua rotina laboratorial, prepare duas, três ou mais suspensões antigênicas com o volume total de 5 mL cada.

Não prepare volumes superiores a 5 mL em um mesmo Erlenmeyer.

Outro cuidado importante é o de nunca alterar os volumes da salina tamponada e do antígeno recomendados pelo fabricante.

Jamais utilize tampas de borracha no Erlenmeyer, pois ocorre a desestabilização das micelas.

Além disso, evite pipetas de plástico para a preparação da suspensão antigênica, porque o antígeno pode se aderir ao plástico.

Ação 4 – Calibrar a agulha

É preciso calibrar a agulha que será usada na seringa para adicionar a suspensão antigênica na reação de VDRL. Para isso, comece cortando o bisel de uma agulha de calibre 18 G (gauge) de tal maneira que a estrutura metálica dessa agulha não fique amassada ou inadequada para uso. Depois, siga os procedimentos indicados no passo a passo a seguir.

Faça a calibração da agulha executando os passos descritos adiante.

1. Coloque a agulha em uma seringa de vidro de 1 mL ou 2 mL.
2. Aspire a suspensão antigênica até o volume acima da marca de 1 mL na seringa.
3. Retire o êmbolo e segure a seringa como se fosse uma pipeta.
4. Posicione a seringa verticalmente sobre o Erlenmeyer vazio.
5. Deixe as gotas da suspensão antigênica fluírem no Erlenmeyer até atingir a marca de 1 mL.
6. Comece a contar cada gota.
7. Pare a contagem quando a suspensão atingir a marca de 0,5 mL na seringa.
8. O resultado esperado é de 30 ($\pm$1) gotas para cada 0,5 mL da suspensão antigênica. Esse volume corresponde a cerca de 17 μL por gota.

Considere que pode acontecer de a calibração não corresponder ao número de gotas esperado. Se o número de gotas for maior que 31, significa que a agulha é fina demais e o volume de antígeno é menor que o indicado para cada gota. Neste caso, você deve substituir a agulha.

Mas, se o número de gotas for menor que 29, você poderá tentar ajustar a agulha pressionando levemente sua ponta com um alicate. Em seguida, repita o teste de calibração da agulha, até encontrar o volume indicado.

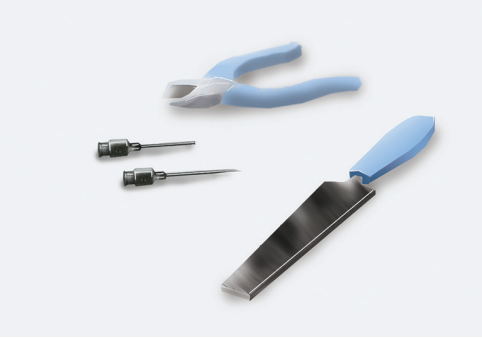


Figura 4 – Agulha calibrada, agulha com bisel, lima e alicate utilizados para calibrar a agulha.

Ação 5 – Utilizar soros controles

Os soros controles são amostras que foram previamente caracterizadas como não reagentes (soros controles negativo) ou reagentes (soros controles positivo).

Seu uso na rotina diária permite ao profissional assegurar-se da qualidade do antígeno e dos testes que realiza.

Veja no próximo tópico como utilizar soros controles para validar a suspensão antigênica. Mais adiante, neste curso, você aprenderá mais sobre este tema ao estudar a respeito do controle de qualidade dos testes de floculação.



Mantenha os soros controles congelados a -20ºC em alíquotas com volume suficiente para que sejam utilizadas uma única vez.

Ação 6 – Validar a suspensão antigênica

Inicie o seu trabalho testando a qualidade da suspensão antigênica para poder validá-la. Para essa tarefa, você deverá dispor de soros controles positivos, com títulos previamente estabelecidos, e de soros controles negativos, selecionados das amostras da rotina de seu laboratório.



Jamais teste as amostras dos usuários sem ter validado a suspensão antigênica.

Acompanhe a seguir o passo a passo dessa tarefa, utilizando como exemplo de validação de uma suspensão antigênica para a qual foi utilizado uma amostra de controle positivo com título 1/16.

1 Coloque a agulha em uma seringa de vidro de 1 mL ou 2 mL.

2 Descongele os soros controles e, posteriormente, faça a **inativação**[3] em banho-maria a 56°C por 30 minutos.

3 Utilize a suspensão antigênica preparada na ação 3.

4 Faça diluições seriadas do soro controle positivo – 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 – diretamente na lâmina, conforme é apresentado a seguir.

a) Pipete 50 μL de solução salina nos círculos de números 3 a 7.

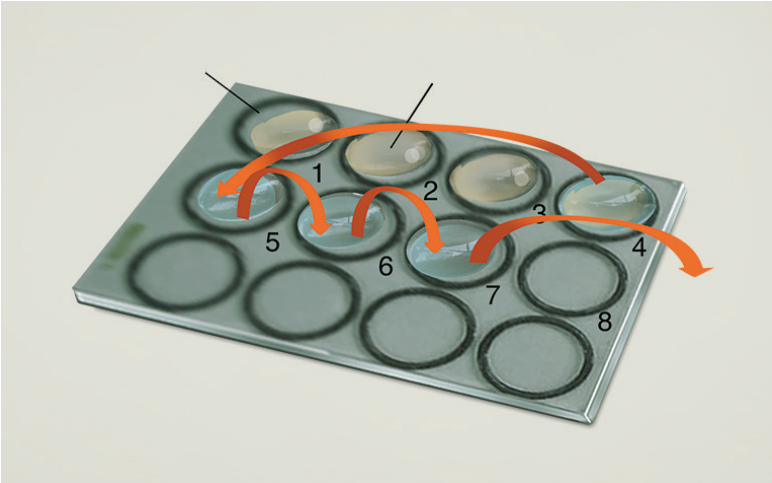
b) Em seguida, pipete 50 μL de soro controle positivo no segundo círculo.

c) Pipete 50 μL de soro controle positivo no terceiro círculo, faça a homogeneização do soro com a solução salina três a quatro vezes, utilizando a mesma pipeta e ponteira. Para isso, aspire e devolva, cuidadosamente, a solução para o mesmo círculo da lâmina. Em seguida, transfira 50 μL dessa mistura para o quarto círculo.

d) Homogeneíze o conteúdo do quarto círculo e transfira 50 μL dessa mistura para o quinto círculo.

e) Proceda com a homogeneização e transfira a mistura sucessivamente até o sétimo círculo.

f) Por fim, homogeneíze a mistura no sétimo círculo, retire 50 μL e despreze-a em recipiente próprio para descarte de produto biológico.



2 - inativação – é o procedimento de aquecer as amostras biológicas (soro, por exemplo) a 56ºC durante 30 minutos para destruir ou tornar inativos os componentes termossensíveis do sistema complemento, para que esse constituinte presente no sangue não interfira no desempenho da reação antígeno-anticorpo *in vitro* (nos testes sorológicos).

5 Pipete no primeiro círculo 50 μL do soro controle negativo.

6 Cuidadosamente, por inversão, homogeneíze a suspensão antigênica.

7 Aspire a suspensão antigênica até encher a seringa, retire o êmbolo, deixe cair algumas gotas para eliminar bolhas de ar e dispense exatamente uma gota em cada um dos círculos de 1 a 7.

8 Coloque a lâmina no agitador orbital e deixe agitar por 4 minutos a 180 rpm.

9 Faça a leitura da reação em microscópio óptico com objetiva de 10X e ocular de 10X, imediatamente após o término da agitação.

10 A suspensão antigênica estará validada se o controle negativo não apresentar floculação e se o controle positivo apresentar o título esperado.

> **!**
>
> Se a suspensão antigênica não tiver produzido o resultado esperado, ela não será validada. Neste caso, prepare outra suspensão antigênica e repita o procedimento de validação com os controles positivo e negativo.
>
> **Não utilize** suspensões que não passaram no teste de validação.

Confira na sequência algumas instruções importantes para fazer a validação da suspensão antigênica.

- Não misture a suspensão antigênica fazendo-a passar pela seringa e pela agulha, pois pode haver quebra das micelas e perda da reatividade.
- Soros controles inativados há mais de 4 horas devem ser reinativados a 56ºC por 10 minutos.
- Você deve validar cada suspensão antigênica já preparada antes de utilizá-la na sua rotina e todas as vezes que preparar nova suspensão.
- A suspensão antigênica do VDRL é estável por até 8 horas.
- Caso você faça RPR, USR ou TRUST, valide também a suspensão antigênica pronta para uso antes de iniciar sua rotina.

Com a suspensão antigênica validada, você pode testar suas amostras, iniciando com o VDRL qualitativo.

Ação 7 – Realizar reação de VDRL qualitativa

Antes de iniciar a reação, faça o protocolo de trabalho para definir em que círculos da lâmina serão colocados os soros controles e as amostras em análise.

DADOS DO SERVIÇO

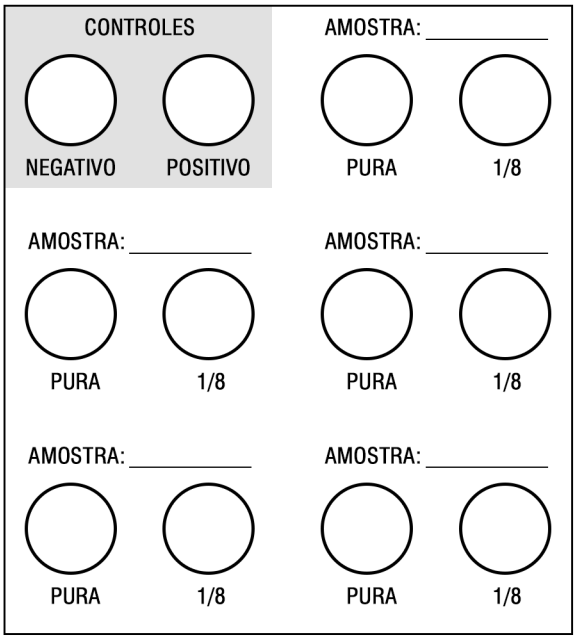
Instituição:

Kit: Lote: Data de Validade: / /

Fabricante:

Responsável pelo teste: Data de realização: / /

VDRL QUALITATIVO



Assinale nos círculos o resultado: R (reagente) ou NR (não reagente).

Neste caso, os soros controles são usados para estabelecer o parâmetro para a leitura da floculação. Eles podem ser usados puros, uma vez que apresentam reatividade conhecida.

O teste qualitativo é realizado com as amostras de soro puro (1/1) e diluído a 1/8. Você deve fazer as diluições a 1/8 em tubos antes de iniciar o teste.

Confira o passo a passo a seguir.

1. Identifique um tubo para cada amostra.

2. Pipete 350 μL de solução salina em cada tubo previamente identificado.

3. Homogeneíze a amostra e pipete 50 μL no tubo correspondente. Com esses volumes você vai obter a diluição de 1/8.

4. Pipete 50 μL do soro controle negativo no primeiro círculo da lâmina de VDRL.

5. Pipete 50 μL do soro controle positivo no segundo círculo.

6. Pipete 50 μL da amostra do usuário 1 pura (1/1) no terceiro círculo.

7. Pipete 50 μL da amostra do usuário 1 diluída a 1/8 no quarto círculo.

8. Repita o procedimento pipetando 50 μL de cada amostra pura e diluída das amostras em análise, tendo o cuidado de seguir a ordem que você estabeleceu no protocolo de trabalho.

9. Faça delicadamente a homogeneização da suspensão antigênica.

10. Aspire a suspensão antigênica até encher a seringa, retire o êmbolo e deixe pingar, no próprio Erlenmeyer, algumas gotas para eliminar bolhas de ar.

11. Dispense exatamente uma gota em cada círculo da lâmina que contenha amostra.

12. Coloque a lâmina no agitador orbital e deixe-a por 4 minutos sob agitação de 180 rpm.

13. Faça a leitura da reação em microscópio óptico imediatamente após o término da agitação. Utilize objetiva de 10X e ocular de 10X.

14. Compare o resultado do controle negativo com o resultado das amostras testadas, para determinar o padrão de ausência de reatividade. Quando a reatividade da amostra estiver igual ao controle negativo, o resultado será **não reagente**. Caso seja observada reatividade na amostra pura ou diluída a 1/8, deverá ser feito o VDRL quantitativo para determinar o título da amostra.

Quando a amostra de soro puro não apresentar reatividade, mas houver reatividade na amostra diluída a 1/8, terá ocorrido o fenômeno de prozona.

Ação 8 – Realizar reação de VDRL quantitativa

Veja agora o exemplo de um VDRL quantitativo com diluições realizadas diretamente na lâmina. Prepare antes seu protocolo de trabalho e defina os círculos nos quais serão pipetados os controles, as amostras e as diluições que serão realizadas.

DADOS DO SERVIÇO

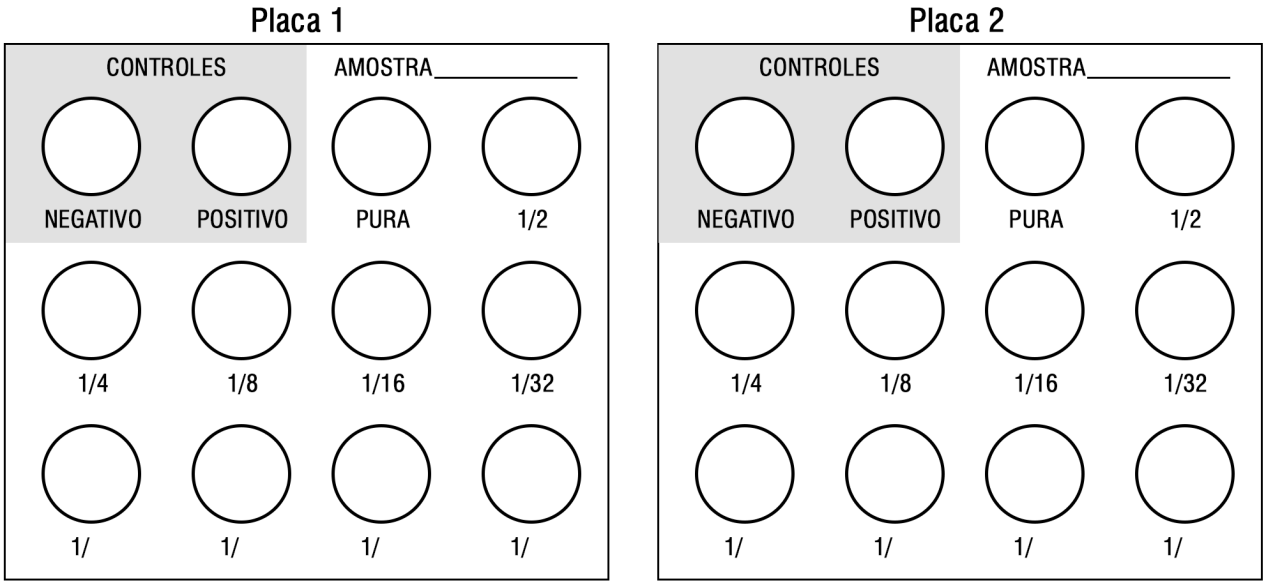
Instituição:

Kit: Lote: Data de Validade: / /

Fabricante:

Responsável pelo teste: Data de realização: / /

VDRL QUANTITATIVO



Assinale nos círculos o resultado: R (reagente) ou NR (não reagente).

Confira os procedimentos do VDRL quantitativo no passo a passo a seguir.

1 Realize diluições seriadas da amostra de 1/2 a 1/32. Você pode fazer a diluição em tubo e transferir 50 μL de cada diluição para a lâmina, conforme previsto no protocolo, ou fazer a diluição diretamente na lâmina. Para isso:

a) pipete 50 μL de solução salina em cada um dos círculos de números 4 a 8;

b) em seguida, pipete no terceiro círculo 50 μL da amostra 1;

c) pipete 50 μL da amostra 1 no quarto círculo, faça a homogeneização do soro e da solução salina três a quatro vezes, utilizando a mesma pipeta e ponteira. Para isso, aspire e devolva, cuidadosamente, a solução para o mesmo círculo da lâmina. Em seguida, transfira 50 μL dessa mistura para o quinto círculo;

d) homogeneíze do mesmo modo o conteúdo do quinto círculo e transfira 50 μL dessa mistura para o sexto círculo;

e) proceda com a homogeneização e transfira, sucessivamente, até o oitavo círculo;

f) homogeneíze a mistura no oitavo círculo, retire 50 μL e despreze em recipiente próprio para descarte de produto biológico.

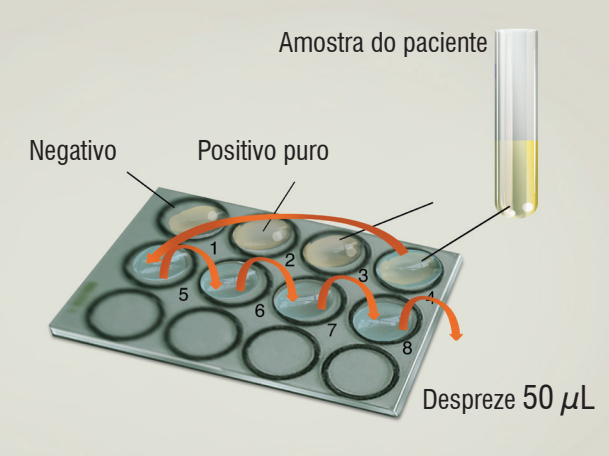


Figura 7a – Diluição da amostra em lâmina.

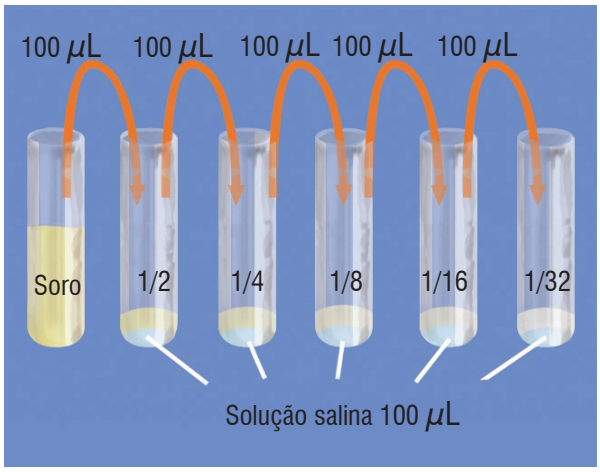


Figura 7b – Diluição da amostra em tubos

2 Pipete 50 μL do soro controle positivo no segundo círculo.

3 Cuidadosamente, por inversão, homogeneíze a suspensão antigênica.

4 Aspire a suspensão antigênica até encher a seringa, retire o êmbolo, deixe cair algumas gotas para eliminar bolhas de ar e dispense exatamente uma gota em cada um dos círculos – do 1 ao 8.

5 Coloque a lâmina no agitador orbital e deixe agitar por 4 minutos a 180 rpm.

6 Faça a leitura da reação em microscópio óptico imediatamente após o término da agitação. Utilize objetiva de 10X e ocular de 10X.

a) Utilize o resultado do controle negativo para determinar o padrão de ausência de reatividade.

b) O título da amostra será definido pela última diluição que apresentar reatividade.

Ação 9 – Registrar e liberar os resultados do teste de VDRL

Ao finalizar a reação, você deverá transferir para o laudo os resultados anotados no protocolo.



As amostras reagentes devem ter o título reportado no laudo.

O laudo deverá apresentar-se:

- legível, sem rasuras na sua transcrição;
- escrito em língua portuguesa;
- datado e assinado por profissional habilitado.



O laudo deverá estar de acordo com o disposto na Resolução RDC nº 302/ANVISA, de 13 de outubro de 2005, suas alterações, ou outro instrumento legal que venha a substituí-la.

Referências

ABO, S.M.; DE Bari, V.A. Laboratory evaluation of the antiphospholipid syndrome. **Ann Clin Lab Sci**. 2007; 37:3-14.

AVELLEIRA J.C.R.; BOTTINO, G. Diagnóstico, tratamento e controle da sífilis. **An. Bras. Dermatol**. 2006; 81(2):111-26.

BERRY, C.D.; HOOTEN, T.M.; COLLIER, A.C.; LUKEHART, A.S. Neurologic relapse after benzathine penicillin therapy for secondary syphilis in a patient with HIV infection. **N Engl J Med**.1987; 316:1587-1589.

BIRNBAUM, N.R.; GOLDSCHMIDT, R.H.; BUFFETT, W.O. Resolving the common clinical dilemmas of syphilis. **Am Fam Physician**. 1999; 59:2233-40, 2245-6.

BRAUNER, A.; CARLSSON, B.; SUNDKVIST, G.; OSTENSON, C.G. False-positive treponemal serology in patients with diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**. 1994; 8:57-62.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendations for Partner Services Programs for HIV infection, Syphilis, Gonorrhea and Chlamydia infections. Morbid **Morttal Wkly Rep**, Recomm Rep. 57(RR-9): 1-93, 2008.

CHESSON, H.W.; HEFFELFINGER, J.D.; VOIGT, R.F.; COLLINS, D. Estimates of primary and secondary syphilis rates in persons with HIV in the United States, 2002. **Sex Transm Dis.** 2005; 32:265-9.

GWANZURA, L.; LATIF, A.; BASSETT, M.; MACHEKANO, R.; KATZENSTEIN, D.A.; MASON, P.R. Syphilis serology and HIV infection in Harare, Zimbabwe. **Sex Transm Infect.** 1999; 75:426-30.

HAAS, J.; BOLAN, G.; LARSEN, S.; CLEMENT, M.; BACCHETTI, P.; MOSS, A. Sensitivity of treponemal tests for detecting prior treated syphilis during human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis**. 1990; 162:862-866.

HICKS, C.D.; BENSON, P.M.; LUPTON, G.P.; TRAMONT, E.C. Seronegative secondary syphilis in a patient infected with the human immunodeficiency virus (HIV) with Kaposi sarcoma. **Ann Intern Med**. 1987; 107: 492-495.

JOHNS, D.R.M.; TIERNEY, M.; FELSENSTEIN, D. Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus. **N Engl J Med**. 1987; 316: 1569-1572.

KARP, G.; SCHLAEFFER, F.; JOTKOWITZ, J.A.; RIESENBERG, K. Syphilis and HIV co-infection. **Eur J Intern Med** 2009; 20(1): 9-13.

KARAMUDI, U.R.; AUGENBRAUN, M. Syphilis and HIV: a dangerous duo. Expert Rev Anti Infect Ther. 2005;3:825-31.

KREISS, J.; CARAËL, M.; MEHEUS; A. Role of sexually transmitted diseases in transmitting human immunodeficiency virus. **Genitourin Med**. 1988; 64:1-2.

LARSEN, S.A., POPE, V., JOHNSON, R.E., KENNEDY, JR., E.J. A Manual of Tests for Syphilis. Washington: **APHA**, 1998, 361p. 9ª edição

LARSEN S.A., STEINER, B.M., RUDOLPH, A.H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin. Microbiol. Rev., Washington, v.8, n.1, p.1-21, 1995.

Schroeter, A. L., J. B. Lucas, E. V. Price, and V. H. Falcone. 1972. Treatment of early syphilis and reactivity of serologic tests. **JAMA** 221:471–476.

SMITH, G.; HOLMAN, R.P. The prozone phenomenon with syphilis and HIV-1 co-infection. **South Med J**. 2004;97:379-82.

TALWAR, S.; TUTAKNE, M.A.; TIWARI, V.D. VDRL Titres in early syphilis before and after treatment. **Genitourin Med.** 1992;68:120-2.

WEBER, J.N.; McCREANER, A.; NERNIE, E.; WADSWORTH, J.; JEFFRIES, D.J.; PINCHING, A.J.; HARRIS, J.R.W. Factors affecting seropositivity to human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) or lymphadenopathy associated virus (LAV) and progression of disease in sexual partners of patients with AIDS. **Genitourin Med**. 1986; 62: 177-180.