

Aula 4

Reações de RPR em amostras de soro

Reação de RPR com amostra de soro

O RPR é um teste não treponêmico que permite a realização do teste sem inativação da amostra e leitura a olho nu. A partir de agora você conhecerá essa reação em detalhes.

A padronização desse teste **determina** que ele seja realizado em cartões descartáveis, de uso único, que contém círculos de 18 mm de diâmetro. Infelizmente existem fabricantes que não incluem esses cartões em quantidade suficiente para a realização dos testes qualitativos e quantitativos. Por isso, alguns laboratórios os reutilizam.

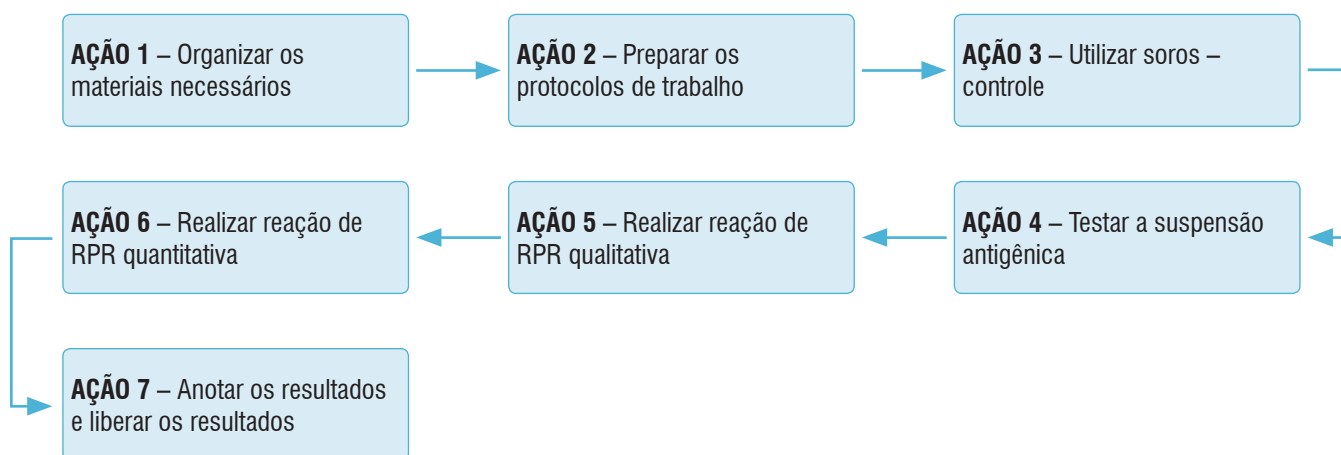
Esse procedimento é inadequado e contraria as boas práticas laboratoriais. Materiais descartáveis devem ser descartados.

Assim, exija que o fornecedor do *kit* entregue os cartões em quantidade suficiente para fazer o número de testes que foram adquiridos pelo laboratório. Se houver recusa, denuncie o fornecedor à Vigilância Sanitária do seu estado.



As recomendações anteriores valem também para o teste TRUST.

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



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.

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

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

- Conjunto diagnóstico (*kit*) para RPR.
- Solução salina (NaCl 0,9%).
- Soros controles: reagente com título conhecido e não reagente.
- Cartões para RPR, demarcados com 12 círculos com 18 mm de diâmetro cada (cartões de RPR).
- Agitador orbital, tipo Kline, ajustado para 180 ± 2 rpm.
- Tubos de ensaio 12 X 75 mm, para as diluições em tubo.
- Pipetas de volume ajustável entre 50 μ L e 200 μ L.
- Ponteiras descartáveis para volumes entre 50 μ L e 200 μ L.
- 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).
- Cronômetro.
- Caneta para escrever em plástico.
- 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: | / / |
| RPR QUALITATIVO | | | | | |
| CONTROLES | | AMOSTRA _____ | AMOSTRA _____ | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| NEGATIVO | POSITIVO | PURA | 1/8 | PURA | |
| _____ | AMOSTRA _____ | AMOSTRA _____ | | | |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| 1/8 | 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 soro ou plasma.
- Leia sempre as bulas e mantenha-as disponíveis para consulta.

Ação 3 – 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 testar a suspensão antigênica de RPR. 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 -20°C em alíquotas com volume suficiente para que sejam utilizadas uma única vez.

Ação 4 – Validar a suspensão antigênica de RPR

Inicie o seu trabalho testando a qualidade da suspensão antigênica.

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 indivíduos sem ter validado a suspensão antigênica. Com esse procedimento, você irá se certificar de que não houve perda de reatividade na reação.

Acompanhe a seguir o passo a passo dessa tarefa, utilizando soros controles positivos com título 16 ou diluição 1/16 com a execução das diluições diretamente no cartão de RPR.

Faça seu protocolo de trabalho marcando a posição dos controles e das amostras.

1 Descongele os soros controles.

2 Utilize a suspensão antigênica do *kit* RPR.

3 Faça diluições seriadas do soro controle positivo – 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 – diretamente no cartão, 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) Realize a homogeneização do 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.

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

5 Cuidadosamente, por inversão, homogeneíze a suspensão antigênica de RPR.

6 Dispense exatamente uma gota em cada um dos círculos de 1 a 7.

7 Coloque o cartão no agitador orbital e deixe agitar por 8 minutos a 180 rpm.

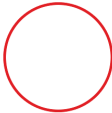
8 Faça a leitura da reação, imediatamente após o término da agitação.

9 A suspensão antigênica estará validada para ser utilizada nas amostras da rotina se o controle negativo não apresentar floculação e se o controle positivo apresentar o título esperado – neste caso, de 1/16.

Caso a suspensão antigênica não seja validada, utilize outro kit de RPR e repita o procedimento de validação da suspensão com os controles. Não utilize suspensões que não passaram no teste de validação.

Ação 5 – Realizar reação de RPR qualitativa

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

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| DADOS DO SERVIÇO | | | | |
| Instituição: _____ | | | | |
| Kit: _____ | Lote: _____ | Data de Validade: ____ / ____ / ____ | | |
| Fabricante: _____ | | | | |
| Responsável pelo teste: _____ | | Data de realização: ____ / ____ / ____ | | |
| RPR QUALITATIVO | | | | |
| CONTROLES | | AMOSTRA _____ | | AMOSTRA _____ |
|  |  |  |  |  |
| NEGATIVO | POSITIVO | PURA | 1/8 | PURA |
| _____ | AMOSTRA _____ | AMOSTRA _____ | | |
|  |  |  |  |  |
| 1/8 | PURA | 1/8 | PURA | 1/8 |
| Assinale nos círculos o resultado: R (reagente) ou NR (não reagente). | | | | |

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 do cartão de RPR.
- 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 8 minutos sob agitação a 180 rpm.
- 13** Faça a leitura da reação imediatamente após o término da agitação.
- 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 RPR qualitativo 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. Saiba mais sobre este fenômeno na Aula 2 do manual, página 2.

Ação 6 – Realizar reação de RPR quantitativa

Veja agora o exemplo de um RPR quantitativo com diluições realizadas diretamente no cartão. Prepare antes seu protocolo de trabalho e defina os círculos nos quais serão pipetadas as amostras, as diluições que serão testadas e os soros controles.

DADOS DO SERVIÇO

Instituição: _____

Kit: _____

Lote: _____

Data de Validade: _____

/ /

Fabricante: _____

Responsável pelo teste: _____

Data de realização: _____

/ /

RPR QUANTITATIVO

| CONTROLES | | AMOSTRA _____ | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| NEGATIVO | POSITIVO | PURA | 1/2 | 1/4 |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 1/8 | 1/16 | 1/32 | | |

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

Confira os procedimentos 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 o cartão, 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 e transfira 50 μL dessa mistura para o quinto círculo;
- d) homogeneíze 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.

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

3 Cuidadosamente, por inversão, homogeneíze a suspensão antigênica.

4 Dispense exatamente uma gota em cada um dos círculos – do 1 ao 8.

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

6 Faça a leitura da reação imediatamente após o término da agitação.

- 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 7 – Registrar e liberar os resultados do teste RPR

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

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.