JANSEN PACHECO NUNES

**CONTRIBUIÇÃO PARA GARANTIA DA QUALIDADE NA
SOROLOGIA DA SÍFILIS**

Tese apresentada à Faculdade de Saúde
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Saúde Pública.

ORIENTADORA : Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini

**São Paulo
1998**

Meus pais Jersey e Nair
Pela origem

Minha esposa Katia
Meus filhos Caio e Camila
Pela paciência
Pelo incentivo
Pela compreensão

A todos os professores do
Departamento de Saúde da Universidade Federal do Acre
Que ainda lutam pela árdua tarefa de ensinar e pesquisar
na difícil realidade da Amazônia brasileira.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico não é uma atividade solitária e faz parte de um conjunto de outras atividades que formam nossas vidas. Assim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e especialmente a minha esposa Katia e meus filhos Caio e Camila pela compreensão que tiveram durante todas as fases do curso.

À Prof^ª. DRA. SANDRA MARIA OTTATI DE OLIVEIRA NITRINI pela forma com que conduziu a orientação do trabalho e a simplicidade na resolução dos problemas.

Ao Prof. Dr. LUIZ FERNANDO DE GOES SIQUEIRA, bravo incentivador e verdadeiro co-orientador deste trabalho, pela inestimável ajuda durante a sua execução, pelo conhecimento apurado, pelas competentes sugestões e principalmente pela amizade.

À ÁREA DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA DA FACULDADE DE SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO por ter cedido o conjunto de soros positivos utilizados na pesquisa.

À Prof^ª. RACHEL CYMROT pelos estudos estatísticos a que foram submetidos os dados encontrados no trabalho.

Ao Laboratório PRÓ-EXAME e a CONTROLBIO pela doação dos kits utilizados.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE, por onde um dia labutei e iniciei minha vida acadêmica.

Aos VOLUNTÁRIOS ANÔNIMOS que doaram seu sangue para formação do conjunto de soros negativos.

SUMMARY

Aiming at designing an updated outline of the behavior of the kits for syphilis serology used in Brazil, 13 (thirteen) sets (09 national and 04 imported) were studied and assessed according to their performance in the V.D.R.L. reaction against a set made up of 41 serums, 21 positive and 20 negative. This was achieved in the same experiment conditions, respecting each manufacturer's particularities. It was surveyed if the kits produced the same response against a particular serum, if there was a variation level of results of a particular serum when tested with different kits, and the reproducibility of results between different lots from the same manufacturer, selected at random. Based in statistic data, it was ascertained that the kits differ concerning classification results and variation level of a particular serum, that is, they present different and varied results when analyzing an only serum, the analysis between lots of a unique manufacturer certified that the kits, in spite of the variations, do not differ statistically regarding the results classification within the conditions determined in the studied serums.

RESUMO

Com o objetivo de traçar um perfil atual do comportamento dos kits utilizados no Brasil para a sorologia da sífilis, foram estudados 13 (treze) conjuntos (09 nacionais e 04 importados) e avaliados segundo sua performance na reação de V.D.R.L., frente a um conjunto de soros conhecido e composto de 41 soros, sendo 21 soros positivos e 20 negativos, nas mesmas condições de experimento e respeitando as particulares de cada fabricante. Foi verificado se os kits produziam a mesma resposta frente a um mesmo soro, se existia um nível de variação de resultados de um mesmo soro quando testado com kits diferentes e a reprodutibilidade de resultados entre lotes diferentes de um mesmo fabricante sorteado aleatoriamente. Baseados em dados estatísticos constatou-se que os kits diferem quanto aos resultados de classificação e nível de variação de um mesmo soro, ou seja , apresentam resultados diferentes e variados quando analisam um único soro. A análise inter-lote de um mesmo fabricante constatou-se que os kits, apesar das variações , não diferem estatisticamente quanto a classificação dos resultados, dentro das condições estabelecidas no conjunto de soros estudado.

ÍNDICE DE TABELAS

Tab. 01 - Distribuição dos resultados obtidos por kit e por soro positivo utilizados	30
Tab. 02 - Distribuição dos escores atribuídos a cada kit em função da positividade dos soros	31
Tab. 03 - Principais características e diferenças dos kits utilizados na pesquisa	32
Tab. 04 - Preços dos kits por fabricante entre julho/setembro-97	33
Tab. 05 - Resultados dos testes de FTA - Abs e ELISA elaborado no conjunto de soros da pesquisa.	34
Tab. 06 - Resultado das reações de VDRL dos soros positivos frente a lotes diferentes de um mesmo fabricante.	37
Tab. 07 - Aplicação das diferenças e postos do número de diluições segundo a Prova de Wilcoxon	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 01 - Padrão de floculação do Controle Negativo frente a um soro negativo não turvo	24
Fig. 02 - Padrão de floculação do Controle Negativo frente a salina	25
Fig. 03 - Gráfico: Distribuição linear dos resultados positivos utilizando kits de lotes diferentes de um mesmo fabricante	38
Fig. 04 - Formação de flóculos Grau 1 (Foto 01)	44
Fig. 05 - Formação de flóculos Grau 2 (Foto 02)	45
Fig. 06 - Formação de flóculos Grau 3 (Foto 03)	45
Fig. 07 - Formação de flóculos Grau 4 (Foto 04)	46
Fig. 08 - Formação de flóculos Grau 5 (Foto 05)	46

ÍNDICE GERAL

SUMMARY

RESUMO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1- INTRODUÇÃO	01
1.1- Histórico da Sífilis	01
1.2- Classificação clínica e testes utilizados nos vários estágios da doença	03
1.3- Histórico das Reações Sorológicas da Sífilis	07
1.4- Precauções e problemas potenciais na Sorologia da Sífilis	10
1.4.1- Testes Não Treponêmicos	10
1.4.2- Testes Treponêmicos	11
1.5- Política de Controle de Qualidade	12
1.5.1- Controle de Qualidade e sua influência na tomada de decisões clínicas	12
1.5.2- Controle de Qualidade em Saúde no Brasil	14
2- OBJETIVOS	17
2.1- Objetivos Gerais	17
2.2- Objetivos Específicos	17
3- MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1- Casuística	18
3.2- Materiais	18
3.2.1- Kits utilizados na pesquisa	18
3.2.2- Equipamentos utilizados na pesquisa	22
3.3- Métodos	23
3.3.1- Randomização dos soros	23
3.3.2- Conservação dos soros	23
3.3.3- Conservação dos Kits	23
3.3.4- Padrão de Floculação do Controle Negativo	24
3.3.5- Particularidades de cada kit	25
3.3.6- Procedimento Técnico	26
3.4- Análises estatística	27
3.4.1- Prova de Friedman	27
3.4.2- Prova de Wilcoxon	28

4- RESULTADOS	29
4.1- Distribuição dos resultados e escores	29
4.2- Características dos Kits e variações por fabricantes	32
4.3- Preços dos Kits entre jul/set/97	33
4.4-- Testes Treponêmicos	33
4.5- Testes de Anti-HIV	35
4.6- Cálculos da distribuição do χ^2_r , (Prova de Friedman) , para todos os Kits	35
4.7- Resultados inter lotes do mesmo fabricante	36
4.7.1- Variação dos resultados positivos	36
4.7.2- Cálculo do valor de T, (Prova de Wilcoxon), para interlotes distintos	39
5- DISCUSSÃO	42
5.1- Apresentação dos Kits no mercado e seus preços correspondentes	42
5.2- Formação do Conjunto de soros positivos	42
5.3- Padrão de Floclulação	43
5.4- Execução das análises	47
5.5- Testes Treponêmicos e anti-HIV	47
5.6- Análises estatística dos resultados obtidos em todos os Kits	47
5.7- Análise estatística dos resultados inter lotes do mesmo kits	49
6- CONCLUSÕES	51
7- PERSPECTIVAS E SUGESTÕES	52
8- BIBLIOGRAFIA	54
9 – ANEXOS	63

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico da Sífilis

Diz a lenda que existiria um pastor de nome Siphilus que de tanto amar o rei Alcithous, chegou não somente a dedicar-lhe culto divino, mas a induzir a tal idolatria o povo de sua terra. Esse ato atraía contra si a cólera dos deuses , principalmente o Deus Sol, que se manifestou sob a forma de terrível e devastadora epidemia, cuja primeira vítima foi o próprio pastor^{1,46}. Essa descrição faz parte do poema MORBUS GALLICUS escrito pelo médico e poeta Girolamo Francastoro, publicado em Verona , Itália, em agosto de 1530, no qual caracteriza a suposta doença que acometia o pastor. O nome SÍFILIS vem da homenagem do poeta ao seu personagem. Segundo outros autores o nome deriva de SYS (porco) e de PHILEIN (amar), ou seja , AMOR PORCO, no sentido de AMOR SUJO, IMUNDO ⁵. Sem dúvida foi uma doença que na Europa antiga deixou um grande rastro de malignidade em função da sua própria forma de disseminação e acometeu muitos personagens importantes da história da humanidade. O aumento da sífilis de forma epidêmica e com alta virulência na Europa Ocidental entre 1492 e 1550 coincidiu com o descobrimento da América o que levou a se pensar erroneamente que seria ela uma doença do continente americano introduzida pelos marinheiros de Colombo através de um foco inicial nas Antilhas, porém é mais provável que a infecção pré existente na Europa e África tenha também atingido proporções epidêmicas como resultado do movimento de tropas e de populações no fim do século XV ⁵. Existem controvérsias sobre o assunto, mas sabe-se que o fato da rápida propagação por toda

Europa deveu-se principalmente às precárias condições de vida na época aliadas a gravidade da doença, pela mortalidade e incapacidade que ocasionava , agravada pela ausência de recursos terapêuticos ⁵⁵.

Estes fatos juntamente com a falta de conhecimentos sobre a moléstia explicava o terror que a palavra sífilis trazia.

O fato de ter se propagado em todo o continente europeu e ser durante muito tempo o mal da época, explica as diferentes denominações que foram aplicadas a sífilis até os dias de hoje: “Mal Gálico”, “Mal Napolitano”, “Mal Americano”, “Lues” (que significa praga) , “Cancro Duro”, “Protosifiloma”, etc.

Os primeiros progressos reais sobre o conhecimento da doença vieram somente no início deste século , precisamente em 1905 pela descoberta por SCHAUDINN E HOFFMAN do seu agente etiológico, o Treponema pallidum, das aplicações da sorologia no diagnóstico por WASSERMANN (1906) e dos estudos do tratamento com arseniais pôr ERLICH (1909). Mais tarde com a descoberta da penicilina e seu uso em larga escala, a incidência da doença caiu rápida e progressivamente em todos os países e parecia ser finalmente a erradicação da sífilis. O sonho acabou com o aparecimento de cepas penicilino-resistentes de outras bactérias e a ocorrência de reações alérgicas , ocasionadas pelo uso indiscriminado do antibiótico.

Estes dois fatos fizeram com que fosse diminuído o uso do antibiótico e apesar de não ter sido encontrado uma linhagem de Treponema pallidum resistente à penicilina , “o aumento da sífilis tem seu registro ligado às vezes” aos mesmos fatores sócio-econômicos e culturais do século passado, como a pobreza, promiscuidade sexual, falta de orientação sobre a doença aliados a outros novos como a evolução e disseminação da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).^{41,48,54}

Como doença, a sífilis representa hoje a terceira mais comum das DST(Doenças Sexualmente Transmissíveis)⁴⁴. é infecto contagiosa, pandêmica, que determina lesões cutâneas polimorfas e dependendo do grau de comprometimento pode atacar particularmente os sistemas cardiovascular e nervoso. Pode ser transmitida por via placentária causando uma infecção congênita do feto pela mãe sífilítica ou adquirida por transmissão direta de pessoa para pessoa através do contato de pele e mucosas, geralmente por via sexual. A possibilidade de transmissão indireta por objetos é considerada remota e excepcional.

Ainda nos dias de hoje, mesmo com todo aparato tecnológico existente, e apesar da sífilis voltar a ser uma morbidade emergente , a notificação não é levada muito a sério e os dados epidemiológicos devem ser analisados com muito cuidado para se evitar erros na sua interpretação. Não se possui dados que possam garantir a real situação da doença, a sub-notificação parece ser grande e as análises dos dados existentes continuam subestimando os verdadeiros danos causados pela sífilis à humanidade.

1.2- CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E TESTES UTILIZADOS NOS VÁRIOS ESTÁGIOS DA DOENÇA

Já se tornou clássica a forma de abordagem da classificação da sífilis em função dos conhecimentos adquiridos e acumulados durante vários séculos sobre como ocorre a aquisição da doença, ou seja , a porta de entrada no organismo, o tempo de adaptação do agente etiológico , isto é, o tempo de incubação e as manifestações clínicas subsequentes.

Assim, a doença é classificada de duas formas, dependendo do tipo de contágio. É chamada de SÍFILIS CONGÊNITA quando ocorre transmissão do Treponema pallidum da mãe sífilítica para o feto, via

placentária, a partir do quarto mês de gestação, ou é chamada de SÍFILIS ADQUIRIDA quando ocorre transmissão direta de indivíduo para indivíduo por contato das mucosas, geralmente, nas relações sexuais.

Na SÍFILIS CONGÊNITA a gravidade e a extensão da infecção após o quarto mês de vida fetal vão determinar o grau de comprometimento da lesão, podendo ocorrer abortos, natimortos, ou surgir manifestações clínicas após o nascimento. Dependendo de características que vão desde a carga e a virulência do Treponema e do estado imunológico desenvolvido, manifestações clínicas vão constituir a SÍFILIS CONGÊNITA RECENTE ou a SÍFILIS CONGÊNITA TARDIA com características clínicas diferentes.

Na SÍFILIS ADQUIRIDA, baseado em observações clínicas e experimentais, é hoje aceita uma classificação didática que se traduz em SÍFILIS RECENTE (também subdividida em primária e secundária), onde ocorrem os primeiros sinais e sintomas da doença, SÍFILIS LATENTE geralmente “silenciosa” após um a dois anos de aquisição da doença sem tratamento ou tratamento insuficiente e finalmente a SÍFILIS TARDIA após o terceiro ano com comprometimento diverso que vai desde o sistema cardiovascular até o sistema nervoso, podendo surgir em qualquer órgão e exigindo às vezes diagnóstico diferencial com outras doenças. Os sintomas e sinais clínicos são variáveis bem como não existe um tempo definido de quando começa ou quando termina determinado estágio da doença.

O estágio de evolução clínica em que se encontra a doença é quem determina o estudo diagnóstico de cada caso, assim, o diagnóstico da sífilis depende tanto dos resultados das reações sorológicas como de um cuidadoso histórico clínico. Esse conjunto de dados determina o tratamento. O uso dos testes diagnósticos nos vários estágios da sífilis é

mostrado nos FLUXOGRAMAS 1, 2 e 3, correspondendo respectivamente a SÍFILIS RECENTE, LATENTE E TARDIA⁵⁰.

FLUXOGRAMA 01: UTILIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS RECENTE (PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA).

FLUXOGRAMA 2: UTILIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS LATENTE.

FLUXOGRAMA 3 : UTILIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS TARDIA.

1.3 - Histórico das Reações Sorológicas da Sífilis

Tradicionalmente os testes sorológicos na sífilis são divididas em dois grupos. Primeiro as clássicas (Não Treponêmicos) como as reações de Wasserman, Kahn, Kline, VDRL normal , VDRL com carvão e RPR. Segundo as específicas (Treponêmicas) como o Teste de Imobilização dos Treponemas (T.P.I), a Absorção de Anticorpos Fluorescentes de Treponemas (FTA-Abs), a Reação de Hemaglutinação Passiva (T.P.H.A.) e as Reações Imunoenzimáticas (ELISA).⁴⁵

Com o passar do tempo algumas reações diagnósticas foram deixando de ser utilizadas em função de aspectos às vezes práticos ou mesmo econômicos. As técnicas de fixação de complemento (Wasserman, Kolmer, Maltaner) foram abandonadas e hoje na prática laboratorial são utilizados como teste de triagem a reação de V.D.R.L. (Venereal Disease Research Laboratory) e suas variações como o teste RPR (rapid plasma reagin) e o Carbotest que empregam antígeno cardiolipídico . O FTA-Abs como teste de confirmação que emprega o *T.pallidum* como antígeno. As reações imunoenzimáticas (ELISA), apesar do custo, tem sido utilizadas, mais em função da praticidade na execução.⁴⁵

A condição ideal para qualquer diagnóstico sorológico em sífilis não existe. Seria aquela onde a reação utilizada apresentasse: alta especificidade, ou seja, reação positiva somente para os casos da doença; alta sensibilidade, isto é, reação positiva com pequena quantidade de anticorpos; simplicidade na sua realização e de baixo custo; por fim, função indicadora de tratamento, isto é, se o tratamento foi suficiente ou não ³⁸. Em busca dessas características ideais foram surgindo com o tempo uma série de reações diferentes onde cada uma delas absorviam inovações baseadas principalmente nos três principais tipos de anticorpos formados na infecção sífilítica: O primeiro tipo de anticorpo lipolítico também chamados de reagina que podem ser pesquisados nas reações de fixação de complemento de Wassermann e nas reações de Floculação de Kahn e análogas que se combinam com o antígeno, constituído pelo extrato do músculo cardíaco ao qual se adicionou colesterol e lecitina; o segundo tipo de anticorpo que reage com componentes protéicos de uma estirpe não patogênica de *T.pallidum* cuja presença pode ser demonstrada na Prova de Reiter de Fixação de Complemento Protéico. Finalmente um terceiro tipo de anticorpo que reage diretamente com uma estirpe patogênica de *T.pallidum* demonstrado pelo Teste de Imobilização de Treponemas, pelo anticorpo

fluorescente (FTA-Abs), Hemaglutinação passiva e testes imunoenzimáticos ^{38,45}.

A positividade das reações sorológicas clássicas (não treponêmicas) é devido a presença das reaginas no soro que nada mais são do que um complexo de anticorpos antilipídico IgG e IgM não imunizantes, formados pelo hospedeiro em resposta ao material lipoidal que atacam rapidamente as suas células, bem como aos lípidos de superfície celular dos Treponemas ³⁸. Como esses anticorpos aparecem 4 a 6 semanas após o aparecimento da infecção, existe um período pré-sorológico, onde, muitas vezes em presença de lesão clinicamente sífilítica, existe uma sorologia negativa. Outra característica das provas clássicas é que elas não são específicas para sífilis e podem ser positivas em outras enfermidades como a boubá, pinta, malária, mononucleose infecciosa e lúpus eritematoso.

Já as reações específicas (treponêmicas) usam *T.pallidum* como antígeno e se baseiam na detecção direta de anticorpos contra componentes celulares. O primeiro teste descrito, o de Imobilização do Treponema ⁴², foi substituído pelo teste de Fluorescência (FTA-Abs) em função da maior facilidade de execução ²⁸.

Em função da subjetividade da leitura microscópica e das variações de sensibilidade do teste, é exigido além da rigorosa padronização dos reagentes a utilização de soros padrões reagente e não reagente para avaliação de cada resultado observado, aliás, fato não exclusivo apenas a este teste. O teste de micro-hemaglutinação é comparável ao FTA-Abs quanto ao resultado tendo a vantagem de ter leitura visual, ser de simples execução e não necessitar de equipamentos. Os cuidados com a padronização dos reagentes devem ser os mesmos e o uso atual de hemácias nucleadas de aves diminuiu o tempo de execução do teste e evitam a interferência de anticorpos heterófilos ⁷.

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) utilizam extratos de *T.pallidum* que são incubados com conjugados enzimáticos anti-IgG humanas, misturas cromógenas, lavagens sucessivas e por fim leitura espectrofotométrica.

Os resultados quando comparados com os de FTA-Abs são semelhantes, embora não totalmente sobreponíveis. Pode-se também através do ELISA detectar anticorpos IgM utilizando o conjugado anti IgM⁴⁷, antes porém deve-se remover as IgG como é feito também para o FTA-Abs. A pesquisa de anticorpos IgM pelo Teste de Imuno-blot tem sido indicada em situações especiais como no diagnóstico da sífilis congênita ^{4,39,56}. Novos testes com novas metodologias ou mesmo aperfeiçoamento dos já existentes e a utilização de determinadas proteínas têm sido citados na literatura, porém, a maioria ainda não comercializado. ^{5,25,30,61}

1.4- PRECAUÇÕES E PROBLEMAS POTENCIAIS NA SOROLOGIA DA SÍFILIS.

1.4.1- TESTES NÃO TREPONÊMICOS

A maioria dos problemas com os testes não treponêmicos podem ser evitados se as instruções de performance, controle dos reagentes e controle de qualidade em geral forem seguidos. Os problemas que nem sempre podem ser evitados incluem as reações pró-zona, os resultados falso positivos e outros erros de interpretação ⁶⁰. As reações pró-zona ocorrem em 1 a 2% dos pacientes com sífilis secundária. Falso positivos ocorrem em geral na população na razão de 1 a 2 % quando se utiliza testes não treponêmicos. ^{8,31,64} Em populações com uso de narcóticos ³⁵ mais que 10% dão resultados falso positivos como também podem ocorrer em diversas doenças febris e na gravidez. Reações falso-

positivas estão também associadas com doenças autoimune tais como artrites e/ou lúpus e com infecções crônicas como a lepra. Títulos falso positivos são usualmente menores que 1:8 mas deve-se ter cuidados visto que títulos baixos aparecem na sífilis latente bem como na tardia . Títulos altos de soros falso positivos também podem ocorrer. Interpretações erradas freqüentemente ocorrem quando:

- A) Falha no reconhecimento da variação para mais ou para menos do ponto final do título, intrínseco a maioria das reações sorológicas.
- B) Falha no estabelecimento da verdadeira positividade do teste,
- C) Falha na obtenção adequada da história clínica do paciente, incluindo aqui, coleta e avaliação de uma possível sífilis congênita. Uma particularidade que leva a uma interpretação errada é o uso de mais de um teste de fabricantes diferentes nas avaliações. Os mesmos testes não treponêmicos devem ser utilizados tanto para a avaliação qualitativa quanto para a quantitativa.

1.4.2- TESTES TREPONÊMICOS

Os testes treponêmicos não são utilizados como procedimento de rotina no levantamento prévio da doença. Seu grande valor está em distinguir um teste positivo não treponêmico de um resultado falso positivo e de estabelecer o diagnóstico de uma latente tardia de uma sífilis tardia. O problema do uso dos testes treponêmicos com “screening” é que 1% da população em geral apresenta resultados falso positivos^{22,31,34} . Embora os resultados falso positivos dos testes treponêmicos sejam freqüentemente de causa desconhecida existe uma associação entre resultados de FTA-Abs falso positivos com a utilização de variedades de drogas induzidas no lúpus eritematoso^{2,33,40,57} . Resultados inexplicáveis podem ocorrer

principalmente em pacientes idosos. O FTA-Abs é um teste extremamente sensível, mas o controle de qualidade e a avaliação dos reagentes são críticos para avaliação e reprodutibilidade dos resultados^{14,27,29}. Reações limites (bordeline) tem sido eliminadas. Estudos tem mostrado que menos que 5% dos resultados falso-positivo estão associados com o diagnóstico de sífilis e que todos eles pertencem ao estágio primário da doença³⁶.

Quando os resultados dos testes treponêmicos discordarem dos dados clínicos, devem ser repetidos e ao mesmo tempo deve-se procurar obter maiores informações sobre o caso.

1.5 - Política de Controle de Qualidade

1.5.1- Controle de qualidade e sua influência na tomada de decisões clínicas.

Os resultados dos exames de laboratório são usados tanto nos processos diagnósticos, monitoramento de terapia quanto no desenvolvimento do ensino e da pesquisa. Vários estágios e fatores estão envolvidos desde solicitação inicial do teste até a aceitação dos resultados e subsequente ação terapêutica. Em todos esses estágios que levam a tomada de decisão clínica, a qualidade, de uma forma generalizada deve estar presente como forma de diminuição dos erros²⁵. As fontes pré-analíticas de variações e erros, como uma coleta mal feita, uma contaminação da amostra, hemólise, acondicionamento errado, etc., cada um com suas características vão interferir no resultado e subsequente na intervenção clínica²¹. Cada procedimento analítico influencia através de suas características próprias tais como : especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo, reprodutibilidade e outros. A imprecisão ou o erro casual é parte inerente aos processos de medidas

embora possa ser minimizada por uma sensata seleção de metodologia e instrumentação, interferindo naturalmente na interpretação dos resultados. A alta imprecisão gera dispersão dos resultados e aumenta o intervalo de referência fazendo crescer a probabilidade de resultados falsos de um simples teste de laboratório. Assim, a imprecisão mostra seu efeito quando os testes são usados para monitorar pacientes, onde a mudança de resultados de um indivíduo é devido não somente a melhoria do seu estado clínico, mas também a fontes de variações pré-analíticas e analíticas. Laboratórios precisam introduzir gerenciamento de qualidade total para determinar todos os caminhos que levam a obter resultados com garantia²⁵. Por isso, existe a necessidade de um monitoramento contínuo na rotina de trabalho que deve percorrer todos os passos dos exames desde a coleta de material, equipamentos e reagentes utilizados, além de outros fatores que não se limitam a procedimentos técnicos como histórico clínico e tratamento. Programas rígidos de controle de qualidade são necessários para garantir a acurácia e a segurança dos resultados obtidos em qualquer setor do Laboratório²¹. Procedimentos preventivos na qualidade do espécime coletado, equipamentos, armazenamento de reagentes e/ou Kits comercializados vão gerar conseqüente diminuição dos erros nos ensaios.²⁶

Quando transportamos a necessidade da existência de um controle de qualidade sobre os kits comercializados no país para o diagnóstico sorológico da sífilis, deparamos primeiro com uma doença que ainda é um sério problema de saúde pública tomando como base os aspectos epidemiológicos dessa morbidade e considerando a diversidade de condições técnicas, infra-estrutura básica, multiplicidade de testes utilizados sem análise prévia do produto, sem protocolo de validação ou teste de conformidade, além das variáveis econômicas nas diferentes regiões brasileiras, torna-se fundamental a implementação de estudos destinados a avaliar o desempenho das rotinas laboratoriais no diagnóstico e controle da sífilis.

Por outro lado, segundo a International Standardization Organization (ISO), a qualidade de um produto ou serviço se define como um conjunto de características do mesmo, relacionada com sua capacidade em satisfazer as necessidades implícitas ou estabelecidas para esse produto ou serviço. Daí se definir **GARANTIA DE QUALIDADE** como o programa total que assegura os corretos resultados finais emitidos pelos laboratórios, com acuracidade pré-estabelecida ^{9,11,12,16,24,59,65}

O aumento das taxas de utilização de kits industrializados destinados a testes laboratoriais de diagnóstico clínico se tornou imprevisível desde os anos 60 ^{3,7,18,20,23,37,66,} e hoje, entretanto, apesar do aumento crescente deste segmento mercadológico, muito pouca atenção vem sendo destinada a qualidade dos reagentes, insumos e kits utilizados em triagem e diagnóstico clínico.^{10,19,62}

Com o passar dos anos um incontável número de kits vem sendo colocado a disposição no mercado brasileiro ^{51,53}, sem nenhum critério de controle, inclusive àqueles utilizados no diagnóstico da sífilis, mesmo com o agravamento dos últimos 10 anos , as crescentes taxas de sífilis congênitas em todo o mundo e particularmente nos países ditos em desenvolvimento. Nos intrincados e complexos programas de combate e controle da sífilis, pouca ou nenhuma atenção vem sendo dada no Brasil ao controle de qualidade dos insumos e reagentes utilizados nos diagnósticos clínicos.

1.5.2 - Controle de Qualidade em Saúde no Brasil

Segundo a Lei 6.360 de 23.09.76, o decreto 79.094 de 05.01.77, que regulamenta esta lei, bem como as portarias 1 de 17.05.93 e 2.043

de 12.12.94 as quais constituem o sistema de qualidade e a definição dos produtos correlatos, sob regime de vigilância estão sujeitos a três tipos de análises: Análise Prévia, para verificação do objeto do registro; Análise de Controle, efetuada após a entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro; e finalmente a Análise Fiscal, efetuada em caráter de rotina para apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual.

Os Laboratórios do Ministério da Saúde ou congêneres da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Territórios, com competência delegada, através de convênios, são responsáveis pelas análises oficiais dos produtos comercializados no país. Nenhum produto submetido ao regime de vigilância sanitária poderá ser industrializado, exposto a venda ou entregue ao consumo, antes de registro no órgão de vigilância sanitária competente do Ministério da Saúde. Qualquer modificação de fórmula, alteração dos elementos de composição ou de seus quantitativos, adição, subtração ou inovação introduzida na elaboração do produto ou embalagem dependerá de prévia e expressa autorização.

No Brasil o órgão encarregado da análise prévia de produtos é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que ainda não realizou uma análise completa e detalhada para o registro de produtos em insumos, reagentes ou kits destinados ao diagnóstico da Sífilis. Existem hoje no mercado cerca de 15 conjuntos, entre nacionais e importados. As discrepâncias existentes entre o performance dos reagentes é tão grande, que compromete inclusive as definições da situação epidemiológica desta morbidade no Brasil.

Um teste que venha sendo utilizado por vários Laboratórios ou durante muito tempo, não representa necessariamente a garantia do

resultado. Para comparar diferentes conjuntos para diagnósticos, torna-se necessário possuir um teste de referência.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

2.1.1- Traçar um perfil atual de comportamento dos kits utilizados no Brasil na sorologia específica da sífilis .

2.1.2- Contribuir para o desenvolvimento de um Programa de Garantia de Qualidade das reações sorológicas utilizadas no seu diagnóstico.

2.2- Objetivos Específicos

2.2.1- Verificar se os kits utilizados no país produzem uma mesma resposta frente a um mesmo soro, nas mesmas condições de experimento e respeitando as particulares técnicas de cada fabricante.

2.2.2- Verificar a existência de um nível de variação de resultados de um mesmo soro quando testado com vários kits diferentes, nas mesmas condições de experimento e respeitando as particularidades de cada fabricante.

2.2.3- Verificar a reprodutibilidade de resultados entre lotes diferentes de um mesmo fabricante, sorteados aleatoriamente.

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Casuística

Foi formado um conjunto contendo um total de 41 amostras de soro congelado, sendo 21 amostras de soro positivo e 20 amostras de soro negativo, selecionados em função da positividade e da negatividade de cada um (no momento em que foi estocado à temperatura de 4° C) e do volume disponível, fazendo com que todos eles pudessem ser utilizados em todas as reações elaboradas na pesquisa.

Os soros positivos foram gentilmente cedidos pela Área de Dermatologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e os negativos foram conseguidos através de doações voluntárias de pessoas que se dispuseram a ajudar o projeto. Todos permaneceram congelados até o momento da elaboração das reações. Com o descongelamento ocorreu precipitação de proteínas e consequentemente turvação dos soros em intensidade variável.

3.2- Materiais

3.2.1 - Kits utilizados na pesquisa

A princípio procuramos adquirir todos os kits utilizados no país porém as dificuldades foram grandes no momento da compra, já que as empresas que fazem a distribuição dos produtos nem sempre estão disponíveis a venda de apenas um kit para pessoa física. Este fato fez com que procurássemos outras formas de aquisição dos mesmos o que

conseguimos através de doações do Laboratório PRÓ-EXAME (Taubaté-SP), da CONTROLBIO (São Paulo-SP) fazendo um total de 13 kits, baseados em metodologia determinada pela Organização Mundial da Saúde⁴³, discriminados a seguir, conforme o fabricante. Os kits de números 07 e 12, apesar de serem fabricados pela mesma empresa, foram considerados diferentes pelas suas próprias características. Foram utilizados Kits com reação de V.D.R.L. tradicional (1,2,5,6,8,9,10,11,12 e 13) e com V.D.R.L. modificado (3,4 e 7).

1- BERHING : VDRL - Cardiolipin Antigen

Fabricante: Behringwerke AG, Marburg, Alemanha

Código do Produto : ORAA 10/11

Código do Lote da embalagem: ORAA 10/11 28598

Código do Lote do antígeno: ORAC 300215B

Código do Lote do líquido diluente: ORBA 300367A

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: 11/07/2000

Registro no Ministério da Saúde: Não consta na embalagem

OBS: Primeiro lote utilizado

2- BIOCLIN : VDRL - PRONTO PARA USO

Fabricante : Quibasa, Brasil

Código do Produto: K.45

Código do lote : 140-A

Data de Fabricação: 06/7

Data de Validade : 02/98

Registro no Ministério da Saúde: Não consta na embalagem

3- BIOKIT : RPR REDISTEST

Fabricante: Biokit S.A., Espanha

Código do produto: 3000-5511

Código do Lote: I-4096

Data de Fabricação : Não consta

Data de Validade: 27/03/98

Registro no Ministério da Saúde: Não consta na embalagem

4- BIOLAB : CARBOTEST VDRL

Fabricante: Diagast Laboratories, França

Código do Produto: 021.644

Código do Lote na embalagem: 618728

Código do Lote do antígeno: 61072

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: 10/98

Registro no Ministério da Saúde : Não consta na embalagem

5- CECON : ANTÍGENO PARA REAÇÃO DE VDRL

Fabricante: Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda.,
Brasil.

Código do produto: Não consta

Código do Lote: 013067

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: Jun/98

Registro no Ministério da Saúde: 10000600001

6- DOLES : VDRL ESTABILIZADO

Fabricante: Doles Reagentes, Brasil

Código do Produto: Não consta

Código do Lote: vdrl 6122

Data de Fabricação: 12/6

Data de Validade: 12/99

Registro no Ministério da Saúde: Não consta na embalagem

7- LABORCLIN : RPR-CORADO L/B

Fabricante: LB- Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda., Brasil

Código do produto: 04-532

Código de Lote: 70414

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: Abril/98

Registro no Ministério da Saúde: 100970100042

8- SANOFI-PASTEUR: VDRL - LATEX

Fabricante: Diagnostics Pasteur, França

Código do Produto: B19380

Código do Lote: 7B063Y/52675

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: 15/02/98

Registro no Ministério da Saúde: Não consta na embalagem

9- TRILAB : VD TESTE TRILAB

Fabricante: Trilab Diagnostica Ltda. , Brasil

Código do Produto : Cat 1002 PM 02017

Código do Lote : 05747

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: 08/98

Registro no Ministério Saúde : Não consta na embalagem

10- WAMA : VDRL/SÍFILIS

Fabricante: Wama Diagnostica, Brasil

Código do Produto: 56250-F

Código do Lote: 66F-01

Data de Fabricação: 01/97

Data de Validade: 04/98

Registro no Ministério da Saúde: Não consta na embalagem

11- WIENER - VDRL TEST

Fabricante: Wiener Lab., Argentina

Código do Produto: 1853151

Código da embalagem: 703534

Código de Lote do antígeno: 701070

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: 02/98

Registro no Ministério da Saúde: 10268590024

12- VDRL - BRAS (Antígeno para Reação de VDRL)

Fabricante :LB- Laborclin Produtos para Laboratório Ltda, Brasil.

Código do Produto: 04-100

Código do Lote: 60905

Data de Fabricação: Não consta

Data de Validade: 09/99

Registro no Ministério da Saúde: 100.970.10032

13- BERHING: VDRL - Cardiolipin Antigen

Fabricante: Berhingewerke AG , Marburg, Alemanha

Código do Produto : ORRA 10/11

Lote da embalagem: ORRA 10/11 27934

Lote do antígeno: ORAC 300214 A

Lote do líquido diluente: ORBA 300366 B

Data de Fabricação: Não consta

Data de Vencimento : 29.08.99

Registro no Ministério da Saúde : Não consta na embalagem

OBS: Segundo lote utilizado

3.2.2- Equipamentos utilizados na pesquisa

- Agitador Orbital de Kline - Marca FANEM - Mod. 255B
- Pipetas Automáticas de 20, 30 e 50 microlitros marca LABSYSTEM

- Termômetro RADIO SHACK (in door/out door) Division of Tandy Corporation, Fort Worth, TX, USA.
- Microscópio binocular OLIMPUS, mod. CBA
- Placas de Kline, com fundo plano
- Câmara úmida (caixa de isopor com tampa e algodão umedecido em água deionizada).

3.3 - Métodos

3.3.1- Randomização dos Soros

Os soros inicialmente foram numerados de 1 a 21 os positivos e de 22 a 41 os negativos. Em seguida, a cada kit trabalhado, essa numeração inicial foi retirada e promoveu-se um sorteio de forma a distribuir aleatoriamente os soros positivos e negativos objetivando evitar o erro de tendenciosidade do procedimento. Após a renumeração dos soros, sem saber previamente quais eram positivos ou negativos, iniciavam-se os testes propriamente ditos.

3.3.2. Conservação dos Soros

Todos os soros foram conservados em geladeira a temperatura entre 4 e 8° C até o momento da realização dos exames quando foram deixados uma hora à temperatura ambiente antes do início do seu processamento.

3.3.3 - Conservação dos kits

Todos os kits foram armazenados segundo as normas determinadas por cada fabricante , em geladeira , com temperatura entre 4 e 8° C.

3.3.4- Padrão de Floculação do Controle Negativo

Antes do procedimento com os soros do conjunto, todos os kits foram testados de duas formas, sendo uma com solução salina e outra com um soro conhecidamente negativo e não turvo, para se estabelecer o **PADRÃO DE FLOCULAÇÃO DO CONTROLE NEGATIVO** de cada um deles.

As fotos abaixo mostram aproximadamente o que se determinou como padrão de floculação, considerando as particularidades de cada kit, no que diz respeito ao seu próprio padrão. Esse padrão de floculação varia entre eles e não traduz necessariamente uma visão única do observador atento para todos os kits.

FOTO 01

Padrão de Floculação do Controle Negativo frente a um soro negativo não turvo.

FOTO 2 **Padrão de Floculação do Controle Negativo frente a solução salina**

3.3.5 - Particularidades de cada kit

Segundo os próprios fabricantes existem muitas variações quando se compara um kit com outro. As principais variações estão na Tabela 3 que mostra diferenças entre indicadores de métodos, no tipo de amostra que pode ser analisada (soro, plasma e/ou líquido), na quantidade da amostra analisada, na quantidade de suspensão antigênica, no número de rotação por minutos que cada amostra é submetido, no tempo dessa rotação e na existência ou não de registro no Ministério da Saúde.

3.3.6- Procedimento Técnico

Após a definição de cada kit a ser utilizado era feito o sorteio dos soros positivos e negativos com numeração prévia definida anteriormente, seguidos de uma renumeração, e ambos, soros e kit, foram deixados à temperatura ambiente por uma hora antes de se iniciarem as análises. Depois foram divididos em 6 (seis) grupos contendo 6 (seis) soros cada e 1(um) grupo contendo 5(cinco) soros, de uma forma que não se repetiam os mesmos grupos de soros nos diferentes kits analisados. A execução das análises foi feita por cada grupo individual e a divisão dos conjuntos (grupos) se fez necessária para evitar evaporação dos componentes do sistema (reagentes e soros) em função do tempo consumido na realização de cada teste. Assim, somente após a execução de todas as diluições correspondentes ao primeiro grupo se iniciava o processamento do segundo, em seguida o terceiro e assim por diante.

Para cada kit analisado inicialmente se efetuou diluições de 1:1 até 1:32 em placas de Kline para cada soro e adicionou-se os antígenos de acordo com que estava estabelecido nas bulas (anexos 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12.) que acompanham os produtos, respeitando assim o que foi preconizado pelos fabricantes e até evitando o efeito pró-zona associados a esse tipo de exame. Em seguida foram colocadas sob agitação, em determinados tempo e velocidade para que fosse feita a leitura do padrão de floculação na maior diluição. Após leitura do primeiro grupo nas diluições citadas aqueles soros que necessitavam de maiores diluições foram diluídos até 1:1024 e repetidos os procedimentos devidos. As placas de Kline após agitação e antes da leitura definitiva permaneceram em câmara úmida para evitar evaporação dos reagentes.

A execução das análises e a leitura dos resultados foram feitas por uma só analista, afim de padronizar a leitura e a execução das técnicas.

3.4- Análise Estatística

3.4.1- Prova de Friedman

Foi escolhido como método de avaliação estatística a PROVA DE FRIEDMAN⁵⁸, por se tratar de um teste não paramétrico baseado na distribuição de Qui-quadrado e utilizado em situações cujos valores não sejam muito exatos como no nosso caso, cuja reação de floculação aplicada (V.D.R.L.) mede intensidade de floculação enquanto etapas de uma diluição e não exatamente a concentração real de anticorpos. Na sua aplicação não se necessita fazer suposições sobre a distribuição da população na qual tenha sido extraído já que as amostras (kits) são consideradas em correspondência entre si visto que o mesmo grupo de soros positivos e negativos foi utilizado para cada um deles.

Para caracterizar a Prova de Friedman os dados se dispõem em uma tabela de dupla entrada com N linhas (N=21 onde cada linha representa um soro utilizado) e K colunas (K=12 onde cada colunas representa um kit utilizado). Aos dados da prova chamamos de POSTOS e atribuímos escores ou resultados separadamente, isto é, aos resultados de cada casela na linha atribui-se postos separados. Assim para os 12 kits os postos variam de 1 a 12. Os resultados de reações realizadas com cada soro são distribuídos em ordem crescente e o valor dos escores finais são resultantes da posição crescente de cada posto. Havendo empate nos resultados, ou seja, soros com o mesmo resultado, utiliza-se o valor do posto médio, proveniente da média aritmética dos postos empatados. A Prova de Friedman determina se é provável que as diferentes colunas de postos (kits) provêm de uma mesma população, utilizando a tabela de distribuição do Qui-quadrado.

3.4.2- Prova de Wilcoxon

Pará fazer a avaliação da situação definida dos resultados inter-lotes, utilizamos a Prova de Wilcoxon ⁵⁸ que é uma ferramenta que atribui maior ponderação a um par de resultados e que acusa grande diferença no número de fases positivas alcançadas. Também é um teste não paramétrico cujos valores resultantes são analisados em uma tabela própria que acompanha a prova. Da mesma forma que a Prova de Friedman atribui postos e escores aos resultados , calculando a menor soma dos postos de um mesmo sinal, que chamamos de T e comparamos com a tabela. Sob um nível de significância definido de 5% aceitamos ou rejeitamos nossa hipótese dependendo se T é menor ou maior que o valor tabelado.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- Distribuição dos resultados e escores obtidos.

A Tabela 1 mostra a distribuição dos resultados dos 12 kits utilizados em função dos soros positivos estudados. Tal disposição foi considerada como o inverso da diluição do soro já que pela própria característica da Prova de Friedman não se dá importância ao valor do número em si, o que vale é a ordem de ocupação de cada resultado nas colunas da tabela. Assim, por exemplo, seria indiferente considerar $\frac{1}{2}$ ou 2 se eles ocuparem a mesma posição. O que vale é a ordem da magnitude dos valores de cada resultado nas linhas da tabela, ou seja, quão grande é esse valor.

Tabela 1: Distribuição dos resultados obtidos por kit e por soro positivo utilizados.

S O R O	KIT	B E H R I N G	B I O C L I N	B I O K I T	B I O L A B	C E C O N	D O L E S	L A B O R C L I N	S A N O F I P A S T E U R	T R I L A B	W A M A	W I E N E R	V D R L - B R A S L B
1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1
2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
4	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5	32	2	1	1	64	1	2	2	2	1	1	2	2
6	1	8	1	2	1	2	1	2	2	4	1	1	1
7	1	1	4	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1
8	1	1	1	2	1	1	1	1	2	4	1	1	1
9	2	4	4	2	1	4	2	2	4	1	4	2	2
10	2	2	2	4	1	2	2	2	4	4	4	2	4
11	32	32	32	64	32	16	32	64	64	64	64	32	32
12	32	128	128	128	32	32	128	64	64	64	64	64	64
13	16	32	32	32	4	16	32	128	32	128	64	64	32
14	32	64	256	512	16	64	64	128	128	128	256	128	64
15	2	2	4	2	4	4	2	8	2	32	2	2	2
16	1	1	8	4	1	1	2	8	2	1	1	1	2
17	2	8	1	16	1	1	1	8	16	16	2	1	4
18	8	4	128	16	16	8	16	16	16	32	32	32	2
19	4	4	4	4	1	4	2	16	16	1	16	4	2
20	8	8	8	16	4	4	16	32	32	16	8	16	4
21	4	16	4	32	8	8	8	32	32	16	8	8	2

Após determinar o valor total dos escores por cada posto, construímos a Tabela 2 que caracteriza justamente a distribuição desses escores atribuídos a cada um dos kits em função da reatividade de cada soro.

Tabela 2: Distribuição dos escores atribuídos a cada kit em função da positividade dos soros.

KIT	B E H R I N G	B I O C L I N	B I O K I T	B I O L A B	C E C O N	D O L E S	L A B O R C L I N	S P A A N S O T F E U R	T R I L A B	W A M A	W I E N E R	V D R - B R A S L B
1	5	11	5	5	11	5	5	5	11	5	5	5
2	11,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	11,5	5,5	5,5	5,5
3	5	11	5	5	5	5	5	5	11	5	5	11
4	10	10	10	4	4	4	10	4	4	4	10	4
5	11	8	3	3	12	3	8	8	3	3	8	8
6	4	12	4	9	4	9	4	9	11	4	4	4
7	4	4	12	4	4	4	4	9,5	9,5	9,5	9,5	4
8	5	5	5	10,5	5	5	5	10,5	12	5	5	5
9	5	10	10	5	1,5	10	5	10	1,5	10	5	5
10	4,5	4,5	4,5	10	1	4,5	4,5	10	10	10	4,5	10
11	5	5	5	10,5	5	1	5	10,5	10,5	10,5	5	5
12	2	10,5	10,5	10,5	2	2	10,5	6	6	6	6	6
13	2,5	6,5	6,5	6,5	1	2,5	6,5	11,5	6,5	11,5	10	6,5
14	2	4,5	10,5	12	1	4,5	4,5	8	8	10,5	8	4,5
15	4	4	9	4	9	9	4	11	4	12	4	4
16	3,5	3,5	11,5	10	3,5	3,5	8	11,5	8	3,5	3,5	8
17	6,5	9,5	3	11,5	3	3	3	9,5	11,5	6,5	3	8
18	3,5	2	12	6,5	6,5	3,5	6,5	6,5	10	10	10	1
19	7,5	7,5	7,5	7,5	1,5	7,5	3,5	11,5	1,5	11,5	7,5	3,5
20	5,5	5,5	5,5	9,5	2	2	9,5	12	9,5	5,5	9,5	2
21	2,5	9,5	2,5	11,5	6	6	6	11,5	9,5	6	6	1
Rj	109,5	149	147,5	161	93,5	99,5	123	186	169,5	154,5	134	111
Rj2	11990,25	22201	21756,25	25921	8742,25	9900,25	15129	34596	28730,25	23870,25	17956	12321

4.2- Características dos Kits e variações por fabricante.

Para evidenciar algumas diferenças entre os kits construímos a Tabela 3 que mostra variações de metodologia entre os mesmos, variações na quantidade e no tipo das amostras e das suspensões antigênicas, tempo de agitação, número de rotações por minuto utilizada por cada um deles, além de registro no Ministério da Saúde.

Tabela 3- Principais características e diferenças dos kits utilizados na pesquisa

FATO- RES KITS	INDICADOR DO MÉTODO	INATIVAÇÃO DO SORO	TIPO DE AMOSTRA	VOLUME DA AMOSTRA (μl)	VOLUME DA SUSPENSÃO (μl)	TEMPO DE ROTAÇÃO (min)	R.P.M.	REGISTRO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE NA EMBALAGEM
BEHRING	Não Tem	sim 30' 56° C	soro/ liquor	50	1 gota ¹	4	180	não
BIOCLIN	Não Tem	não	soro/ plasma	50	20	5	não tem	não
BIOKIT	Não Tem	não	soro/ plasma	50	1 gota ²	8	100	não
BIOLAB	Carvão	não	soro/ plasma	50	1 gota ³	6	180	não
CECON	Não Tem	não	soro/ liquor	50	20	4	não tem	sim
DOLES	Não Tem	não	soro/ plasma liquor	50	20	5 a 8	não tem	não
LABORCLIN RPR-	Não Consta	não	soro/ plasma	50	20	8	100	sim
SANOFI PASTEUR	Não Tem	não	soro/ plasma	30	1 gota ⁴	6	não tem	não
TRILAB	Não Tem	não	soro/ plasma liquor	50	20	4	180	não
WAMA	Não Tem	não	soro/ plasma	50	20	4	180	não
WIENER	Não Tem	não	soro/ plasma liquor	50	1 gota ⁵	4	180	sim
VDRL- BRAS-LB	Não Tem	sim 30' 56°c	soro/ liquor	50	17	4	180	sim

¹ 1 gota = 17 μl

² 1 gota = 17 μl

³ 1 gota = 10 μl

⁴ 1 gota = quantidade não especificada pelo fabricante.

⁵ 1 gota = 10 μl

4.3- Preços dos kits entre jun/set/97

Foram verificados os preços dos produtos na época da execução da pesquisa que constam na tabela abaixo:

Tabela 4 – Preços dos kit por fabricante entre jul/set/97 .

KIT/FABRICANTE	VALOR EM R\$	VARIAÇÃO DE RELAÇÃO À MEDIA
BERHING	110,00	+ 69,49
BIOCLIN	12,00	- 28,51
BIOKIT	67,00	+ 26,49
BIOLAB	43,30	+ 2,79
CECON	42,00	- 1,49
DOLES	27,00	- 13,51
LABORCLIN / RPR	39,00	- 1,51
SANOFI/PASTEUR	47,00	+ 6,49
TRILAB	27,00	- 13,51
WAMA	32,00	- 8,51
WIENER	16,00	- 24,51
VDRL-BRAS/LB	23,90	-16,61

Preço Médio : R\$ 40,51

Variação em relação à: - 28,51 a + 69,49

4.4- Testes treponêmicos

Foram feitos dois testes treponêmicos (FTS-Abs e ELISA) para confirmação dos resultados no conjunto de soros utilizado.

Tabela 5 – Resultados dos testes de FTA-Abs e ELISA elaborados no conjunto de soros da pesquisa.

AMOSTRA	FTA-ABS	ELISA
R01	REAGENTE	REAGENTE
R02	REAGENTE	REAGENTE
R03	REAGENTE	REAGENTE
R04	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
R05	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
R06	REAGENTE	REAGENTE
R07	REAGENTE	REAGENTE
R08	REAGENTE	REAGENTE
R09	REAGENTE	REAGENTE
R10	REAGENTE	REAGENTE
R11	REAGENTE	REAGENTE
R12	REAGENTE	REAGENTE
R13	REAGENTE	REAGENTE
R14	REAGENTE	REAGENTE
R15	REAGENTE	REAGENTE
R16	REAGENTE	REAGENTE
R17	REAGENTE	REAGENTE
R18	REAGENTE	REAGENTE
R19	REAGENTE	REAGENTE
R20	REAGENTE	REAGENTE
R21	REAGENTE	REAGENTE
N22	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N23	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N24	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N25	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N26	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N27	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N28	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N29	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N30	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N31	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N32	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N33	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N34	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N35	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N36	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N37	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N38	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N39	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N40	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE
N41	NÃO REAGENTE	NÃO REAGENTE

4.5 -TESTES ANTI- HIV

Os 41 soros do painel, sendo 21 positivos e 20 negativos para sífilis, foram testados contra a presença de anticorpos anti-HIV , pela técnica de ELISA , e todos eles apresentaram resultado negativo.

4.6- Cálculos da distribuição do χ^2_r (Prova de Friedman) para todos os kits.

A Prova de Friedman determina se os totais de postos R_j (colunas) diferem significativamente . Para aplicar esta prova, calculamos o valor de uma estatística que Friedman denotou por χ^2_r . Como o número de linhas e colunas não é pequeno, pode-se mostrar que χ^2_r tem distribuição aproximadamente qui-quadrado, com grau de liberdade igual a $(k-1)$. Assim temos:

$$\chi^2_r = \frac{12}{Nk(k+1)} \sum_{j=1}^k (R_j)^2 - 3N(k+1)$$

Onde:

N = número de linhas

K = número de colunas

R_j = soma dos postos na coluna j

Rejeitamos H_0 se o valor da estatística χ^2_r for maior que o valor tabelado $\chi^2_{k-1, 5\%}$ utilizando-se um nível de significância para o teste de 5%.

Para os dados deste estudo, temos :

$$N=21 \text{ soros e } k=12 \text{ kits} \quad \sum_{j=1}^{12} R_j^2 = 233113,5$$

Logo:

$$\chi^2_r = \frac{12}{21 \times 12 \times 13} (233113,5) - 3 \times 21 \times 13 = 853,8956 - 819 = 34,8956$$

g.l. = $k-1 = 11$ (grau de liberdade)

$\chi^2_{11, 5\%} = 19,675$ (Tabela do χ^2 - Nível de significância de 5%)

R.C. = $\{\chi^2 / \chi^2 \geq \text{ou} = 19,675\}$ (região crítica)

$\chi^2_r = 34,8956 \in \text{R.C.}$

Portanto: χ^2_r pertence a Região Crítica

4.7- Resultados inter-lotes do mesmo fabricante.

4.7.1- Variação dos resultados positivos

Baseados nos resultados dos dois lotes da Berhing sorteados anteriormente, construímos a Tabela 6 que caracteriza os resultados das reações de V.D.R.L. dos 21 soros trabalhados.

Tabela 6 - Resultados das reações de VDRL dos soros positivos frente a lotes diferentes de um mesmo fabricante

SOROS POSITIVOS	BERHING ORAC 300215 B	BERHING ORAC 300214 A
	(1) ORBA 300367 A	(2) ORBA 300366 B
1	1	1
2	2	1
3	1	1
4	2	2
5	32	4
6	1	1
7	1	2
8	1	1
9	2	1
10	2	4
11	32	32
12	32	256
13	16	32
14	32	128
15	2	4
16	1	1
17	2	4
18	8	32
19	4	4
20	8	64
21	4	8

O gráfico 01 mostra os dados da Tabela 6 visualizados de uma outra forma, mostrando as variações inerentes aos kits utilizados frente a um mesmo soro.

Gráfico 01: Distribuição linear dos resultados positivos do mesmo soro utilizando kits de lotes diferentes de um mesmo fabricante.

4.7.2- Cálculo do valor de T , (Prova de Wilcoxon), para inter-lotes de lotes distintos.

Para testarmos a hipótese nula de que os kits da Berhing provenientes de dois lotes distintos não diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros, utilizamos a Prova de Wilcoxon ⁵⁸ já que podemos atribuir maior ponderação a um par que acusa grande diferença no número de fases positivas alcançadas, ou seja, grande diferença no número de diluições alcançadas. Assim consideramos para cada par de resultados, isto é, para o mesmo soro classificado pelos dois lotes diferentes , as diferenças do número de fases (ou diluições) positivas alcançadas por eles (número de diluições do lote 2 menos o número de diluições positivas do lote 1). Desprezamos os pares onde não houveram diferenças (soros de número 1,3,4,6,8,11,16 e 19) , resultado assim em 13 pares para o estudo. Distribuímos postos ao valor absoluto destas diferenças e a cada posto foi atribuído o sinal da diferença obtida por cada par. Os resultados do que foi descrito são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Aplicação das diferenças e postos do número de diluições segundo a Prova de Wilcoxon.

SORO	DIFERENÇAS DO NÚMERO DE DILUIÇÕES	POSTOS DAS DIFERENÇAS DO NÚMERO DE DILUIÇÕES
1	0	-
2	-1	-4,5
3	0	-
4	0	-
5	-3	-12,5
6	0	-
7	1	4,5
8	0	-
9	-1	-4,5
10	1	4,5
11	0	-
12	3	12,0
13	1	4,5
14	2	9,5
15	1	4,5
16	0	-
17	1	4,5
18	2	9,5
19	0	-
20	3	12,0
21	1	4,5

A prova de Wilcoxon considera como igual a T a menor soma dos postos de mesmo sinal (positivos ou negativos), fixa o nível de significância do teste e compara T com um valor de uma tabela própria. Se T superar o valor tabelado, sob o nível de significância fixado e considerando N igual ao número de pares sem empates, rejeitamos a hipótese de que dois lotes distintos proveniente do mesmo fabricante, não diferem quanto a

classificação dos diversos soros, ou seja , não geram resultados diferentes.

Para os dados deste estudo temos:

$T = 21.5$ (menor soma dos postos de sinal negativo)

$N = 13$ (número de postos com diferenças)

Nível de significância do teste = 0,05 %

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

5.1- Apresentação dos Kits no mercado e seus preços correspondentes.

Não existe padronização em relação a identificação de todos os kits trabalhados. São variáveis as formas de codificar cada produto apresentado, ora caracterizando a embalagem ora caracterizando os lotes dos componentes. A maioria não apresenta data de fabricação e são colocados rótulos apenas com o prazo de validade do kit. O número de registro no Ministério da Saúde aparece em apenas 04 (quatro) kits dos 13 (treze) estudados. Dos kits importados nenhum deles traz as informações da bula traduzidas para o português. Um estudo mais detalhado de cada bula não foi nosso objetivo e por isso nos atemos somente aos dados que interessavam ao trabalho. Por outro lado, existe uma variação de preços muito grande (- 28,51 a + 69,49) em relação à média (R\$ 40,51), às vezes subestimados e outra vezes superestimados, como os kits importados, levando o consumidor a confusa e falsa ideia de que eles geram resultado isoladamente melhores. Os valores por cada teste isolado não foram comparados em função de que nem todos os kits trazem a quantidade de testes a serem realizados.

5.2-Formação do Conjunto de soros positivos

A utilização na pesquisa de um conjunto definido de soros positivos conhecido veio em função de algumas dificuldades práticas que foram sendo detectadas quando da programação de execução do trabalho, principalmente na obtenção de um soro padrão da OMS (Organização Mundial da Saúde). Esses soros foram escolhidos não tanto em função

da reatividade de cada um deles mas principalmente do volume existente de cada amostra o que determinou a possibilidade de se trabalhar com todos os soros e todos os kits existentes. Assim selecionou-se os soros que tinham quantidade suficiente para realizar todas as análises previstas. A reatividade inicial de cada um deles já era previamente estabelecida pela soroteca da Área de Dermatologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. O conjunto de soros foi formado por :

- 04 soros com título 1:1
- 04 soros com título 1:2
- 02 soros com título 1:4
- 02 soros com título 1:8
- 01 soro com título 1:16
- 03 soros com título 1:32
- 02 soros com título 1:64
- 02 soros com título 1:128
- 01 soro com título 1:256

5.3- Padrão de floculação

Antes da execução propriamente dita das análises cada kit foi testado frente a uma solução salina estéril e um soro exaustivamente negativo e não turvo. Verificou-se que quando comparados, apresentavam entre si, intensidade de floculação diferentes e que seria necessário estabelecer um Padrão de Floculação para cada kit sem que ocorresse interferência quando da hora da leitura por um único técnico. Essa é uma das grandes dificuldades existentes na rotina dos Laboratórios do país já que nem sempre o fornecedor tem a disposição o kit do mesmo fabricante e a variação do Padrão de Floculação nem sempre é vista pelo técnico que executa a rotina. As leituras são tão discrepantes que uma reação poderia ser negativa para um leitor e positiva 1:4 para outro. Em função

dessas variações definimos que as análises fossem lidas por apenas um técnico e que a cada kit estudado fosse definido o seu próprio padrão de floculação como forma de apagar a memória fotográfica adquirida pelo técnico no kit trabalhado anteriormente. Não se pode estabelecer um padrão único como se os kits, apesar de definirem uma mesma doença, pertencessem a uma mesma população padronizada. Se atentarmos para variações correspondentes a cada estado clínico da doença as dificuldades de definição dos títulos serão maiores, mesmo para um observador com prática, principalmente nas definições de títulos muito baixos, por exemplo 1:1 e 1:2 , quando comparados com títulos negativos.

Alguns kits como o da BERHING e o da SANOFI/PASTEUR trazem imagens de floculação como se elas representassem o que acontece na hora da reação. Na realidade não passam de insinuações e que podem até confundir um observador desatento. Seria como nas fotos abaixo onde se tem a princípio uma visão crescente da formação de grânulos (grau 1 < grau 2 < grau 3 < grau 4 < grau 5) na reação de aglutinação mas que na realidade é uma imagem distorcida se fosse considerada como padrão para qualquer um dos kits estudados.

FOTO 1

Formação de flóculos Grau 1

FOTO 2

Formação de flóculos Grau 2

FOTO 3

Formação de flóculos Grau 3

FOTO 4

Formação de flóculos Grau 4

FOTO 5

Formação de flóculos Grau 5

5.4- Execução das análises

Em todas as análises elaboradas na pesquisa, foram utilizados kits dentro do prazo de validade e respeitadas todas as orientações dos fabricantes no que diz respeito às condições técnicas inerentes a cada um deles, desde acondicionamento, inativação ou não do soro, volumes pipetados, preparo das soluções de uso quando necessárias, temperatura, umidade, tempo e intensidade de rotação e microscópio. Além desses fatores foi utilizado somente um leitor para todos os testes.

5.5- Testes treponêmicos e anti-HIV

Os testes treponêmicos (FTA-Abs e ELISA) foram utilizados como testes confirmatórios e elaborados para confirmar a potencialidade dos soros formadores do conjunto. Os soros de número R04 e R05, considerados inicialmente reagentes, deram resultados NÃO REAGENTE frente aos testes treponêmicos o que pode caracterizar um resultado falso positivo nos testes não treponêmicos. Já o teste para anticorpos anti-HIV foi utilizado como forma de proteção a manipulação do conjunto de soros e até a possível eliminação de alguns soro, fato que não ocorreu no trabalho.

5.6- Análise estatística dos resultados obtidos em todos os kits.

Considerando os 12 kits estudados como amostras individuais, verifica-se que os mesmos se apresentam numa escala ordinal em função da ordenação do grau crescente de positividade, assim quanto maior a quantidade de anticorpos maior a positividade. O que queremos é comprovar a hipótese nula (H_0) de que os 12 kits provem da mesma população, ou seja, de que os 12 kits não diferem quanto aos resultados de classificação individual dos soros.

Hipótese estatística:

Queremos testar a hipótese nula:

H_0 : os 12 kits não diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

Contra a hipótese alternativa:

H_a : Os 12 kits diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

Se a hipótese nula de que os kits não diferem quanto a classificação dos diversos soros e portanto, provém da mesma população, for verdadeira, espera-se que os postos de 1 a 12 apareçam com frequências aproximadamente iguais. Isto indica que, para qualquer soro, é uma questão de acaso sob qual kit ocorrerá o maior escore. Portanto se os escores dos soros forem independentes dos kits, os totais de postos para as diversas colunas seriam aproximadamente iguais. Se os escores dos soros dependessem de qual kit foi utilizado (isto é, H_0 fosse falsa), então os totais de postos variariam de uma coluna para outra. Como todas as colunas contém o mesmo número de casos (soros), uma afirmativa equivalente seria que, sob H_0 , os postos médios das várias colunas (kits) seriam aproximadamente iguais.

Com a aplicação da Prova de Friedman verificou que o valor do χ^2_r é igual a 34,8956. Segundo a tabela do Qui-quadrado pertence a região crítica qualquer valor maior ou igual a 19,675.

Logo ao nível de significância de 5%, rejeitamos H_0 , isto é, afirmamos que os kits diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros já que o valor encontrado para o χ^2_r pertence a região crítica.

Observou-se também, conforme tabela 2, uma variação na somatória dos postos por colunas, ou seja, por kit, que numa escala crescente demonstra que os kits com menores somatória atingem um menor grau de positividade(ou menor diluição) e aqueles com maior somatória atingem um maior grau de positividade (ou maior diluição).

5.7- Análise estatística dos resultados inter-lotes do mesmo kit.

Baseados na Tabela 5 verifica-se a existência de discordância na classificação dos resultados dos diversos soros quando comparamos simplesmente os dois lotes analisados. Porém , utilizando a Prova de Wilcoxon temos que testar as duas hipóteses a seguir:

Queremos testar a Hipótese Nula:

Ho: Os dois kits da Berhing provenientes de lotes distintos não diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

Contra Hipótese Alternativa:

Há : Os dois kits da Berhing provenientes de lotes distintos diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

Consultado a tabela própria para a Prova de Wilcoxon, verifica-se que o valor tabelado é igual a 17. Calculamos o valor de $T = 21.5$. Como $T = 21.5 > 17$, não rejeitamos Ho ao nível de significância de 5%.

Assim, nas condições utilizadas no trabalho, onde se utilizou um conjunto de 21 soros conhecidos, afirmamos que os dois kits de lotes distintos da Berhing não diferem quanto ao resultado de classificação dos soros.

Como a classificação em um dos kits não tendeu sempre a positivar em mais ou em menos fases (diluições) que a classificação do outro kit, havendo alternância em suas classificações (notar soros 5,12 e 20) , o teste não foi capaz de detectar diferença entre os dois kits. Vale salientar

que dos 21 soros, houve concordância de classificação em apenas 8 deles (38,1%) e que em 5 (23.8%) a discordância na classificação dos resultados foi de duas ou três diluições. Assim, deve-se levar em consideração o fato de termos trabalhado com um conjunto de soro positivo conhecido, o que gera interpretações diferentes dos resultados obtidos de pacientes isolados na clínica médica. Assim, um resultado reagente 1/64 pode ser clinicamente diferente de 1/512 quando é interpretado pelo médico assistente e deve gerar decisões diferentes nos tratamentos.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

6.1-Os Kits não pertencem a uma mesma família e conseqüentemente não geram o mesmo resultado frente a um mesmo soro, isto é, diferem quanto aos resultados de classificação dos diversos soros.

6.2- Há uma variação de resultados entre o mesmo soro quando testado por Kits diferentes.

6.3-Os soros testados por lotes diferentes de um mesmo fabricante, demonstram pertencer a uma mesma família, entretanto apresentam variações nos títulos.

PERSPECTIVAS E SUGESTÕES

7- PERSPECTIVAS E SUGESTÕES

Deve constituir uma perspectiva do país na busca da garantia total da qualidade, alcançar numa forma inicial, os seguintes passos:

1º) Produção de um painel padrão validado pelo soro padrão de referência da Organização Mundial da Saúde, com objetivos de análise prévia para registro do produto.

2º) Obrigatoriedade de novo registro dos produtos existentes, com exigência aos fabricantes, de um padrão mínimo de performance do produto (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo).

3º) Desenvolvimento no Brasil dos programas de Controle de Qualidade Interno, Controle de Qualidade Externo e Proficiência para os profissionais da área da saúde diretamente ligados ao diagnóstico sorológico da sífilis.

Embora os testes não treponêmicos sejam a base para a sorologia da sífilis existem evidências claras de que eles não possuem padronização rigorosa e que as exigências mínimas para a garantia da qualidade dos resultados não estejam sendo cumpridas. Já em 1984, JORGE ⁶¹ , cujo trabalho questionava resultados e não kits utilizados, sugeria a implantação de um programa de controle de qualidade. Em 1988, CAMARGO ⁶⁵ identificava a necessidade de um controle de qualidade nas reações utilizadas no país, ou seja, dos kits comercializados desde

aquela época e alertava que os resultados destes testes possuíam apenas valor de probabilidade, variando segundo vários e diferente fatores. Por isso os resultados precisam ser ponderados e adequadamente valorizados pelo médico, de acordo com os dados clínicos e epidemiológicos, acrescido de uma análise pré e pós analítica. Hoje, 1998, não temos mais nenhuma dúvida: ou controlamos a qualidade dos insumos ou vamos continuar tendo resultados duvidosos comprometendo todos os componentes envolvidos no sistema, desde os laboratórios fabricantes de resultados até médicos e pacientes.

BIBLIOGRAFIA

8- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1.AMARAL, A . – Moléstia e termo através da história. Inst. Nac. do Livro (MEC). 1965
- 2.ANDERSON,B.; STILLMAN, M.T.. False-positive FTA-ABS rin hydralazine-induced lupus. JAMA 1978;239:1392-3.
- 3.BAREFORD, H.A.- Inapropriate use of Laboratory service: Long term combined approach to modify request patterns. BR Med. J., 301:1305, 1990
- 4.BAUGHN, R. Congenital syphilis: Immunology challenges. Pathol. Immunopathol. Res., 8:161-178, 1989.
- 5.BIER, O . - Bacteriologia e Imunologia. 23^a. Edição. Ed. Melhoramento, São Paulo-SP, 1984
- 6.CAMARGO, M.E.- A sífilis avança: progride o diagnóstico?. Rev. Assoc. Med. Bras. 34(1):19-23.1988.
- 7.CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A . V.; ROCCA,A . ; BELEM, Z.R. – Hemapallidum, reagente nacional para o teste treponêmico de hemaglutinação na sífilis. Avaliação dos resultados. Rev. Bras Patol.Clin. 23:42,45, 1987

- 8.COHEN, P.; STOUT, G.; ENDE, N.- Serologic reactivity in consecutive patients admitted to a general hospital. Arch Intern Med 1969; 124:364-7.

- 9.COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS. Effective Laboratory Testing. College of American Pathologists. 1985

- 10.CONN, R.B.- Clinical Laboratories: Profit center, production industry or patient-care recourse ? N.Engl. J.Med., 298:422-7, 1978

- 11.CONSTANTINE, N.T.- Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. AIDS, 7:1-13, 1993.

- 12.CONSTANTINE, N.T., CALHAN, J.D. & WATTA, D.M.- HIV Testing and Quality Control. A guide for laboratory personnel. Publisher: Family Health International, 1991. 170 pp

- 13.CRUICKSHANK, R., DUGGOD, J.P., MARMION, B.P. & SWAIN, C.H.A. Medical Microbiology. A guide to the Laboratory Diagnosis and Control of Infection. 12th Edition. Churchill Livingstone. London. 1975

- 14.DANS, P.E.; JUDSON, F.N.; LARSEN, S.A. ; LANZ, M.A. ; The FTA-ABS test: a diagnostic help or hindrance ? South Med J 1977;70:312-15.

- 15.DETTORI, G.; GRILLO, R.; MORA, G.; CAVALLI, A. ; ALINOV, A. ; CHEZZI, C.; SANNA, A. - Evaluation of western immunoblotting technique in the serological diagnosis of human syphilitic infections. Eur. J. Epidemiology. 5(1): 22-30. 1989
Ed. Guanabara-Koogan, 1976

16. EDDY, D.M.- Common screening test. Philadelphia: American College of Physicians 1991. Edition . Churchill Livinstone. London. 1975.
17. EICHNA, J.W.- Medical school education, 1975-1979: A student's perspective. N.Engl. J.MedEduc., 308:727-34, 1984
18. EISENBERG, J.M. – Na educational program to modify laboratory use by house staff.- J.Med.Educ. 32:578-81, 1997
19. FIELDS, H.A., DAVIS, C.L., BRADEY, D.W. & MAYNARD, L.E.- Experimental condictions affecting the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hepatitis B surface antigen (HbsAg). Bull. W.H.O.- 61:135-142, 1983.
20. FINEBERG, H.V.- Clinical Chemistries: The hight cost of low-cost diagnostic test. In: ALTMAN, S.H. & BLENDEN, R., Eds. Medical Technology: The Culprit Behing Health Care Cost ? Publication (PHS) 79-3216. U.S. Dep. Of Health Education and Welfare, 1979, pp 144-65.
21. FRASE, C.G.. Interpretation of clinical laboratory data. Oxorf. Blackwell Scientific. 1986.
22. GOLDMAN, J.N.; LANZ, M.A . ;- FTA-ABS and VDRL slide test reactivity in popuulation of nuns. JAMA 1971; 271:53-5.
23. GRINER, P.F. – Medical House Staff. Use of laboratory teste in a teaching hospital. Long term trend: Reductions in use and relative cost. Ann. Intern. Med., 90:243-8, 1979.
24. GRINER, P.F. & GLASER, R. – Misuse of laboratory and diagnostic procedures. N.Engl. J. Med., 307:1336-9, 1982

25. HANNING, I. & FRASER, C.G. - Why quality ? The effects of performance on clinical decision-making. The British Council. Effective quality assurance for clinical laboratories. Birmingham. 1996

26. HARRISON, T.C.; MALIC, A .0- Immunoassays . In: Quality Control - Principles and practice in the Microbiology Laboratory. Public Health Laboratory Service. London. 1991.

27. HUNTER, E.F.; ADAMS, M.R., ORRISON, L.H.; PENDER, B.J.; LARSEN, S.A .- Problems affecting performance of the fluorescence treponemal antibody-absorption test for syphilis. J Clin Microbiol 1979;9:163-6.

28. HUNTER, E.F.; deacon, w.e.; meyer, p.e. – An improved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS). Public Health Rep., 79:410-2, 1962

29. HUNTER, E.F.; MADDISON, S.E.; LARSEN, S.A .; FELKER, M.B.; FEELEY, J.C.- Immunoglobulin specificity for the fluorescent treponemal antibody-absorption test conjugate. J Clin Microbiol 1976;4:338-42.

30. IJSSELMUIDEN, O . E.; SCHOULS, L.M.; STOLZ, E.; AELBERS, G.N.; AGTERBERG, C.M.; TOP, J.; VAN EMBDEN, J.D. - Sensitivity and specificity of immunosorbent assay using the recombinant DNA derived Treponema pallidum protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and the potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. J.Clin.Microbiol. 27(1):152-7, 1989.

31. JAFFE, H.W., LARSEN, S.A. ; DANS, P.E.- Hemagglutination tests for syphilis antibody. Am J Clin Pathol 1978; 70:230-3.

32. JORGE, J.C.- Controle De qualidade de reações sorológicas para a sífilis em Laboratórios de saúde de Florianópolis- Santa Catarina. [Tese apresentada a Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública. 1984].

33. KRAUS, S.J.; HASERRICH, J.R.; LANTZ, M.A. ; - Fluorescence treponemal antibody absorption test reactions in lupus erythematosus. N Engl J Med 1970;282:1287-90.

34. LARSEN, S. A. ; HAMBIE, E.A ; PETTI , D.E.; PERRYMAN, M.W. & KRAUS, S.J.- Specificity, sensibility and reproducibility among the fluorescence antibody absorption test, the microhemagglutination assay for Treponema pallidum antibody, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J Clin Micro. 1981.; 14:441-5

35. LARSEN, S.A. - False-positive nontreponemal tests by syphilis serology. Summary Report. American Society of Clinical Pathologists. 1982;19:2-3.

36. LARSEN, S.A. ; HUNTER, E.F.; PENDER, B.J. Et al – Stability of fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-ABS) test staining intensity. (Abstract) 5th International Meeting of International Society for STD Research. Seattle. Washington: 1983:119.

37. MARTIN, A.R.; WOLF, M.A. & THIBODEAU, L.A. - A trial of two strategies to modify the test-ordering behavior of medical residents. N.Engl.J.Med, 303:1330-6, 1980

38. MATHEUS H.M.; YANG, T.K.; JENKIN, H.M. – Unique lipid composition of Treponema pallidum (nichols virulent strain). Infect Immun. 1979;24:713-19
39. MAYER, M.P. ; EDDY, T.; BAUGHN, R.C. - Analysis of western blotting (immunoblotting) technique in diagnosis of congenital syphilis. J.Clin.Microbiol. 32(3):629-33.1994.
40. MONSON, R.A .; Biologic false-positive FTA-ABS test in drug-induced lupus erythematosus. JAMA 1973;224:1028-30.
41. NANDWANI, R.; EVANS, D.T. - Are you sure it's syphilis ? A review of false positive serology. Inf. J.STD-AIDS, 6(4)241-8. 1995.
42. NELSON, R.A .; MEYER, M.M.;- Imobilization of Treponema pallidum in vitro by antibody produced syphilitic infection. J.Exp.Med.,89:369-93,1984
43. O.M.S– Manual de reacciones para el diagnostico de la sífilis. Publication Científica No. 311. 1975.
44. PARIS, H.A .- Syphilis in 1991. J.Clin.Neuroophthalmol. 11(3):144-51. 1991.
45. PARIS-HAMELIN, A . & CATALAN F.- Techniques de laboratoire applicables aux diagnostics des M.S.T.. Librairie Le Francois. Paris. 1978.
46. PASSOS, M.R.L.- Doenças Sexualmente Transmissíveis. Editora Cultura Médica Ltda, Rio de Janeiro-Rj, 1985.

- 47.PIANTIERE, G.; LOMBARDO, F.; PEDERSOLI, G.; VANINI, G.F.;
BANFI, F. - Importance of looking for specific IgM in serological investigations of syphilis. Ann.Ig 1(6):1427-30 . 1981. Italy.

- 48.PULIDO, O .F.; RUBIO, G.R.; SALMERON B.O .J.; CASTILLA, C.V.;CARNEVALI, R.D.; PEREZ, H.J.R; DEL PALACIO, M. A .
Reactivity on serologic test for detection of syphilis in patients infected with immune deficiency virus. Med. Clin. Barc.101(10):365-7. 1993

- 49.PEREZ,H.J.R.; DEL PALACIO, M.A . - Reactivity on serologic test for the detection of syphilis in patients infected with the human immune deficiency virus. Med.Clin.Barc. 101(10):365-7. 1993

- 50.PUPIN, D. – Doenças venéreas: Estudo clínico, diagnóstico e Tratamento Universidade Federal do Espírito Santo. 1973.

- 51.QUALITY ASSESMENT AND IMPROVEMENT. In: 1992 Joint Commission Accreditation manual for hospital. Oakbrook Terrace. IL: Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations, 1991, pp. 137-43.

- 52.RETHLEV, T.- Hemagglutination test utilizing pathogenic Treponema pallidum on the serodiagnostic of syphilis. Br. J.Vener.Dis., 43:181-5.1967.

- 53.RHYNE, R.L.; GEHLBACH, S.H.- Effectsof a educational feedback strategy on physician utilization of thyroid function test. Farm. Pract., 8:1003-7, 1079

- 54.ROMPALO, A . M.; CANNON, R.O .; QUINN, T.C.; HOOK, E.W.-
Association of biologic false-positive reations for syphilis with

- human immunodeficiency virus infection. J.Infect.Dis. 165(6):1124-6. 1992
- 55.SAMPAIO, S.P.S., - Sífilis – In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Veronezi, R.,Ed. Guanabara-Koogan-1976
- 56.SANCHEZ, P.J.; MACCRACKEN JR., G.H.; WENDEL, G.D.; OLSENK.; THRELKELD, N.; NORGARD, M.V. – Molecular analysis of the fetal IgM response to Treponema pallidum antigens: Implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. J.Infect.Dis., 159:508-17,1989.
- 57.SHORE, R.N.; FARICELLI,J.A .;- Boderline and reactive FTA-ABS test results in lupus erytematosus. Arch Dermatol 1977;113:37-41.
- 58.SIEGEL, S.- Estatística não paramétrica (para ciências do comportamento). Editora McGraw-Hill. 1975
- 59.SOX, H.C.JR.- Common Diagnostic Test: Use and Interpretation. Philadelphia: Americam College of Physicians. 1990.
- 60.SPANGLU, A . S., JACKSON, J.H., FIUMARA, N.J., WARTIN, T.A .- Syphilis with a negative blood test reaction. JAMA 1996; 189:87-90
- 61.STIENTRA, S.; PEETERS, T.; VAN DER STRAATEN, A .M.; KADIR, N.; Treponema pallidum membrana protein A - Elisa; A new test for screening and diagnosis of syphilis. Beitr.Infusionsther. 30:85-91. 1992.
- 62.TAYLOR, R.N.; HOUNG,A .Y.; FULFORF, K.M.; PRZYBYSZEWSKI,V.A. & HERN, T.L.- Quality control for

immunology tests. U.S. Dept. of Health Hum. Serv. – CDC, HSH, 82:8376, 1979, 111p.

63.WENTWORTH, B.B. & JUDSON, F.N.- Laboratory Methods for the diagnosis or sexually transmitted diseases. American Public Health Association. Washington . 1987

64.WENTWORTH, B.B.; THOMPSON M.A.; PETER, C.R.; BAWDON, R.E.; WILSON, D.L.- Comparasion of a hemagglutination treponemal test for syphilis (HATTS) with other serologic methods for the diagnosis of syphilis. SEX Trans Dis 1978;5:103-11.

65.W.H.O. Guidelines for organizing national external quality assessment schemes for HIV serological testing. Global Programa on AIDS. WHO, 1991. 15p.

66.WINKELMAN. J.W.- Less utilization of the clinical laboratory procedures disproportionales small true cost reductions. Human Pathol., 15:499-501,1984.

ANEXOS

ANEXO 01

BEHRING

VDRL Cardiolipin-Antigen

for the cardiolipin microflocculation test

Composition

Behringwerke Reagents for the cardiolipin microflocculation test

VDRL Cardiolipin Antigen, from beef containing in alcohol solution:

cardiolipin	0.3 g/l
lecithin	2.1 g/l
cholesterol	9.0 g/l

Dilution Liquid (pH 6.0), containing

formaldehyde	0.58 g/l
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	93 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l
NaCl	10 g/l

For control of the reaction and estimation of the cardiolipin antibody:
Syphilis Control Serum, positive

Use

VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) cardiolipin antigen according to HARRIS et al. serves for demonstration and estimation of the lipid antibody in serum and cerebrospinal fluid.

Method

Principle

In the presence of lipid antibodies an agglutination (flocculation) with cardiolipin antigen occurs. In the negative case the suspension remains homogeneously turbid.

Preparation of the Antigen Suspension: Place 0.4 ml of dilution liquid in a glass-stoppered bottle (30 ml) and add 0.5 ml drop by drop while shaking the bottle. The pipette or needle must not come into contact with the dilution liquid. Blow out the last drop, and continue to rotate the bottle for a few seconds.

Add 4.1 ml of dilution liquid and close the bottle tightly.

Vigorously shake the bottle vertically for 10 sec. The suspension must be used on the same day that it was prepared.

Preparation of the Serum or Cerebrospinal Fluid: Inactivate clear sera for 30 min at 56 °C. Samples which have been inactivated more than 4 hours previously should be reactivated for 10 min at 56 °C. Cerebrospinal fluid is not to be inactivated.

Procedure

1. Slide Test with Serum

- Place 0.05 ml of inactivated serum on a slide with wells (14 mm Ø) and distribute the serum.
- Add 1 drop of antigen suspension (= 1/100 ml) with a 1 ml glass syringe and a calibrated No. 1 cannula.
- Then rotate the slide in a rotator for 4 min at approx. 180 rpm and a circle diameter of 1.0 cm.

Evaluate immediately after rotation under a microscope at a magnification of 100 x.

no lumps	non-reactive
no clearly defined lumps	borderline reactive
small, but clearly detectable lumps	weakly reactive
large lumps	reactive

4. Slide Test with Cerebrospinal Fluid

Preparation of Sensitized Antigen Suspension for the Cerebrospinal Fluid Test

Mix equal parts of antigen suspension (see above) and a 10% saline solution, shake well, and allow to stand for from 5 min up to a maximum of 2 hours before testing.

- Place 0.05 ml of cerebrospinal fluid on a slide with wells, and distribute thoroughly.
- Add 1 drop (= 1/100 ml) of sensitized antigen suspension with a syringe and a calibrated No. 12 cannula.
- Then rotate the slide in a rotator for 8 min at approx. 180 rpm.

Evaluate immediately after rotation under a microscope at a magnification of 100 x.

Uniform turbidity of the suspension, no flocculation or lumps	non-reactive
Clearly defined lumps in a clear surrounding	reactive

Determination of the antibody content

For estimation of the cardiolipin antibody the slide test is performed with 0.05 ml each of a geometric series of dilutions of inactivated serum or of cerebrospinal fluid. For dilution of sera it is advisable to use dilution fluid pH 6.0, and for cerebrospinal fluid physiological saline solution. The corrected mean titer or the number of international units per ml are yielded by comparative titration of the positive control serum in accordance with the recommendation of the Federal German Health Office. The titer is considered to be the reciprocal value of the last dilution step determined as "reactive".

Caution: In preparing the antigen suspension, the instructions given above must be adhered to with the utmost accuracy. The cannulas employed for dosage of the antigen suspension should be checked for drop size. This may be effected by counting the drops from a known amount of antigen suspension. Care must be taken that all the drops are the same size.

Diagnostic Significance

The latest view of demonstration and estimation of cardiolipin antibodies within the framework of syphilis diagnosis is that it is of diagnostic importance mainly for monitoring the course of disease and assessing the success of therapy. The findings obtained have to be looked at in conjunction with results of treponema-specific tests (IgM-FTA-AES, FTA-AES, indirect haemagglutination).

In connection with assessment of findings attention is drawn to the relevant literature.

References

- Bundesgesundheitsblatt 18, 1 (1975)
Bundesgesundheitsblatt 22, 396 (1979)
Lager, A., Wiener klin. Wochschr. 92, 375 (1980)
Hagedorn, H. J., Naumann, P., Dtsch. med. Wochschr. 104, 209 (1979)
Gelson, H. P., Soeflg. H. P., Lab. med. 3, 23 (1979)
Roser, H., Arzt. Lab. 22, 252 (1976)
Cacciapuoti, B., Ciceroni, L., Passani, L., Bolletino dell'istituto sieroterapico Milanese

Manufacturer:	Behringwerke AG, Marburg, Germany
USA Distributor:	Behring Diagnostic Inc. 151 University Avenue Westwood, MA 02090 USA

Edition October 1995

Continuação
BEHRING

ANEXO 01

= non reactive/nicht reagierend/
négatif/negativo

= borderline reactive/fraglich reagierend/
positif douteux/reacción dudosa

+= weakly reactive/schwach reagierend/
positif faible/débilmente positivo

++= reactive/reagierend/
positif/positivo

+++= reactive/reagierend/
positif/positivo

++++= reactive/reagierend/
positif/positivo

ANEXO 02

BIOCLIN

Bioclin

VDRL PRONTO PARA USO

MÉTODO IMUNOLÓGICO
SOMENTE DIAGNÓSTICO 'IN VITRO'

FINALIDADE

Método para detecção da Sífilis.

FUNDAMENTO

O antígeno de cardiolipina, adicionado de lecitina e colesterol, em contato com reaginas (anticorpos) presentes no soro e no líquido cefalorraquidiano, produzem a formação de floco, indicando uma reação sugestiva para Sífilis.

PROPRIEDADES DO MÉTODO

A BIOCLIN desenvolveu um teste para detecção de Sífilis em fluidos corporais, utilizando cardiolipina bovina, colesterol e lecitina purificados, padronizado segundo as normas da Organização Mundial de Saúde.

O perfilho balanceamento entre os três componentes, expostos em uma solução alcoólica, aumentam sua sensibilidade e especificidade, diminuindo assim a porcentagem de reações biológicas cruzadas.

A utilização de um tampão colina, acrescido de substâncias conservantes e estabilizantes leva a uma estabilidade de 8 meses do antígeno pronto para uso.

REAGENTES

1 - ANTÍGENO VDRL - Conservar entre 2 - 8°C

AMOSTRAS

- Soro. Não é preciso inativar
- Líquido cefalorraquidiano.

TÉCNICA

TESTE QUALITATIVO

Além do soro sem diluir, é recomendada uma diluição de 1:8 com solução salina para todos os testes para evitar o efeito de pro-zona.

1 - Em uma placa escavada pipetar 0,05 ml do soro sem diluir e 0,05 ml de soro diluído 1:8.

2 - Em seguida adicionar 0,02 ml da suspensão antigênica.

3 - Agitar manualmente com movimentos circulares ou em um agitador por 5 minutos.

4 - Examinar em um microscópio no aumento de 100x.

RESULTADO

POSITIVO: presença de grumos de tamanhos variados; neste caso, proceder à diluição do soro e realizar o teste semi-quantitativo.

NEGATIVO: ausência de grumos, apresentando uma suspensão de aspecto homogêneo.

TESTE SEMI-QUANTITATIVO

Proceder às diluições do soro com solução salina.

Adicionar 0,02 ml da suspensão antigênica e proceder da mesma forma do teste qualitativo.

Considerar-se como o título a maior diluição da amostra onde ocorreu floculação.

TESTE COM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

1 - Diluir a solução antigênica 1:2 com soro fisiológico; deixar em repouso por 5 minutos.

2 - Proceder da mesma forma que para o soro, usando o líquido cefalorraquidiano centrifugado. Não é necessário inativar.

RECOMENDAÇÕES IMPORTANTES

1 - Armazenar entre 2 - 8°C. No momento do uso, retirar da geladeira e deixar chegar à temperatura ambiente.

2 - Homogeneizar a suspensão antigênica no momento do uso.

3 - Sempre que for realizado o teste qualitativo, utilizar, além da amostra sem diluir, uma diluição de 1:8 para evitar o efeito de pro-zona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRADWOLLS, Clinical Laboratory Methods and Diagnosis - Sonnen wirth and Jarret, Mosby Co. - 1960.

Manual de reações para el diagnóstico de la Sífilis - nº 311 - Organização Mundial de Saúde.

APRESENTAÇÃO

Reagentes	Embalagem Normal
Reagente Nº 1	5 ml

NÚMERO DE TESTES

Embalagem	Nº de testes
Normal	300

RPR reditest

Rapid test for the qualitative and quantitative determination of syphilis in serum or plasma.

SUMMARY

RPR reditest is a non-treponemal procedure for the rapid diagnosis of syphilis. **RPR reditest** is a variation of the standard VDRL technique, and has equivalent specificity and sensitivity in addition to offering several advantages:

- Ready to use reagent
- Long shelf-life
- Inactivation of the specimen is not necessary
- Either serum or plasma may be used
- Easy reading of results

These characteristics of **RPR reditest** make it very useful as a qualitative test when a large number of samples must be processed.

PRINCIPLE

The RPR antigen is a cardiolipin suspension containing charcoal microparticles. This antigen detects an antibody, traditionally called "reagin", present in the serum of syphilitic patients and also occasionally in the serum of patients with some other acute or chronic diseases. When a specimen contains reagins, a flocculation of the antigen is produced, which coagglutinates with the charcoal microparticles giving black clumps of different size depending of the reagin titer. With nonreactive specimens, no reaction will take place and a homogeneous grey colour will be maintained.

REAGENTS

RPR reditest includes the following:

- a) RPR antigen suspension:
0.003% cardiolipin, 0.020 - 0.022% lecithin, 0.09% cholesterol, 0.0125 M EDTA, 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.01 M KH_2PO_4 , 0.1% thimerosal, 10% oblique chloride w/v, 0.01% charcoal microparticles and distilled water.
- b) Positive control:
Liquid, prepared from immune rabbit serum. Contains 0.1% sodium azide.

PRECAUTIONS

RPR reditest is intended for *IN VITRO* diagnostic use.

The positive control contains sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to form lead or copper azide in laboratory plumbing which may explode on percussion. Flush drains with water thoroughly after disposing of fluids containing sodium azide.

STORAGE

The RPR antigen and positive control will remain stable until the expiration date, shown on the label, if stored between 2 and 8°C. Do not freeze. Exposure to temperatures above 30°C should be avoided; such conditions may cause a rough appearance of the antigen when tested with nonreactive sera.

The antigen transferred into the dispensing vial and stored between 2 and 8°C, is stable for up to three months, or until expiration date, whichever occurs first.

When stored, the antigen normally shows a complete sedimentation. Once shaken the antigen should be uniform.

Although the reagents contain preservatives, they are still sensitive to contamination. Handle with necessary precautions.

MATERIAL PROVIDED

- RPR antigen
- Positive control
- Antigen dispensing vial

MATERIAL REQUIRED NOT PROVIDED

- A mechanical rotor for circumscribing a 2 cm diameter circle on a horizontal plane (100 rpm)
- Stop watch
- Saline solution (0.9% NaCl, only for quantitative technique)
- Automatic pipettes (only for quantitative technique)
- Normal human serum for diluting specimens giving a positive result at the 1:16 dilution

SPECIMEN COLLECTION

SERUM:

Use fresh serum collected by centrifuging clotted blood. If the test can not be carried out on the same day, the serum may be stored at 2-8°C for no longer than 48 hours after collection. For longer periods the sample must be frozen (-20°C).

PLASMA:

Collect blood in a tube containing anticoagulant (EDTA, CPDA-1, sodium citrate). Other anticoagulants should be evaluated before use. Centrifuge the blood to separate plasma from cellular elements. Test the specimen within 24 hours of blood collection.

NOTE:

Discard grossly hemolyzed, contaminated or oily specimens.

PROCEDURE

PREVIOUS MANIPULATIONS

Antigen preparation:

- Gently shake the antigen vial to resuspend it. Avoid vigorous shaking.
- Attach the needle to the dispensing vial and transfer the required quantity of antigen from the glass vial to the plastic dispensing vial by collapsing it.
- Label the dispensing vial with the antigen lot number, expiration date and date antigen is placed in the vial.

Control of the RPR antigen:

- Before doing a set of determinations it is advisable to control the RPR antigen with the positive control included in the kit.
- The positive control should be evaluated following the **QUALITATIVE PROCEDURE**, using its own dropper.
- When tested, the positive control should produce distinct flocculation of charcoal microparticles. If the antigen tested does not produce the expected result, repeat the control test, and discard the antigen in case flocculation is not produced.

QUALITATIVE PROCEDURE

- Allow the antigen and positive control to reach room temperature (23 to 29°C).
- Using a dispenser, deliver one drop of the specimen to be tested onto a circle of the disposable card. When using automatic pipettes deliver 50 µl.
- Using the broadened end of the dispenser, spread the specimen over the entire surface of the circle.
- Discard dispenser after use.
- Gently shake the antigen dispensing vial and holding the vial in a vertical position, dispense several drops into the cap of the dispensing vial to assure the needle passage is clear. Then, dispense one free-falling drop of antigen onto each circle containing the specimen. Do not mix. Recover the antigen from the cap.
- Rotate the card for 5 minutes on a mechanical rotor at 100 rpm.
- Briefly rotate and tilt the card manually to differentiate minimally reactive from nonreactive specimens. Read macroscopically under a high intensity incandescent lamp.
- Upon completion of daily tests, clean the needle with distilled water, close the vials and store them at 2-8°C.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

Reactive: Characteristic black clumping of charcoal from slight to intense.
Nonreactive: A grey homogeneous suspension or only slight roughness.

ANEXO 03
BIOKIT S.A.

It is recommended to perform the quantitative procedure to determine the titer of a reactive specimen.

Some specimens may show a nonreactive roughness which tends to be a graininess around the periphery with a homogeneous suspension in the center of the circle. A brief rotating and tilting of the card by hand can help to differentiate this from minimal types of reaction.

QUANTITATIVE PROCEDURE

Allow the antigen and positive control to reach room temperature (23 to 28°C). Preparation of the serum dilutions on the slide (see the descriptive diagram for the technique):

- Place 50 µl of saline onto each one of the card circles 2 through 5.
- Using an automatic pipette, place 50 µl of specimen onto circle 1 and 50 µl directly into the drop of saline in circle 2.
- Using the same pipette aspirate and expel several times the mixture of specimen and saline in circle 2 until they are well mixed.
- Transfer 50 µl of the mixture made in circle 2 directly into the drop of saline in circle 3.
- Repeat the aforementioned operations, transferring 50 µl from circle 3 to 4 and so on, in succession, through circle 5, thereafter discarding 50 µl.

Circle	1	2	3	4	5
Saline µl	—	50	50	50	50
Specimen µl	50	50	—	—	—
Mix and transfer		50	50	50	50
Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16

- Using the broadened end of the dispenser, spread the specimen over the entire surface of the circle starting at the highest dilution. Proceed to the next lower dilution until the contents of all circles are spread.
- Discard dispenser after use.
- Gently shake the antigen dispensing vial and holding the vial in a vertical position, dispense several drops into the cap of the dispensing vial to assure the needle passage is clear. Then, dispense one free-falling drop of antigen onto each circle containing the specimen. Do not mix. Recover the antigen from the cap.
- Rotate the card for 8 minutes on a mechanical rotator at 100 rpm.
- Briefly rotate and tilt the card manually to determine end point of reactivity. Read macroscopically under a high intensity incandescent lamp.
- Upon completion of daily tests, clean the needle with distilled water, close the vials and store them at 2-8°C.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

The approximate titer will correspond to the highest dilution that still presents a clearly visible positive reaction.

If the 1:16 dilution is positive, proceed as follows:

- In a test tube, prepare a 1:16 dilution of the specimen by adding 1.5 ml of saline to 0.1 ml of specimen.
- Prepare a 1:50 dilution of normal human serum in saline.
- Follow quantitative procedure by using the 1:16 specimen dilution as a new sample and the 1:50 normal human serum dilution as a diluent.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The diagnosis of syphilis should not be made without the support of patient history or clinical evidence. Any reactive specimen should be confirmed using the quantitative procedure and subjected to further studies to verify the presence of specific antibodies.

False positive reactions have been reported in diseases such as leprosy, malaria, toxoplasmosis, infectious mononucleosis, lupus erythematosus, viral pneumonia and in pregnancy. Bacterial contamination and severely hemolyzed samples may also produce false positive results.

Do not use on spinal fluid.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Each lot of **RPR reagent** is tested in parallel with previously released antigen lots using human sera with different degrees of reactivity.

Laboratory evaluations were performed using, as a basis for comparison with the **RPR reagent**, another commercially available RPR card test and the VDRL slide test (Centers for Disease Control, as a reference method). The reported results shown that the **RPR reagent** has adequate sensitivity and specificity in relation to clinical diagnosis. Agreement was 98.6% between the commercial RPR card test and **RPR reagent**, 97.8% between the VDRL slide test and **RPR reagent**, and 97.6% between the commercial RPR card and VDRL slide tests.

REFERENCES

- Dorwart, B.B. and Myers, A.R. Comparison of Rapid Plasma Reagin Card Test and Venereal Disease Research Laboratory Test in the Detection of Biological False Positive Reactions in Systemic Lupus Erythematosus. *Brit. J. Vener. Dis.* 50: 435-438, 1974.
- Fischer, G.S., Kiege, R. and Colevitz, M.T. Reactivity of a Rapid Plasma Reagin Card Test with Low-Titer Sera. *J. Clin. Microbiol.* 12: 435, 1984.
- Manual of tests for syphilis, 1989. U.S. Public Health Service Publication No. 411.
- Paris-Hamelin, A., Valaman, A. et Fusco-Barbours, B. Serodiagnostic de la Syphilis avec l'antigène "VDRL-Charbon". *Faillites de Biologie* 15: 39-42, 1974.
- Perryman, M.W., Larsen, S.A., Hamble, E.A., Pettit, D.E., Mulisay, R.L. and Whittington, W. Evaluation of a New Rapid Plasma Reagin Card Test as a Screening Test for Syphilis. *J. Clin. Microbiol.* 15: 286-290, 1982.
- Portnoy, J., Gerson, W. and Smith, C.A. Rapid Plasma Reagin Test for Syphilis. *Public Health Rep.* 72: 781-786, 1957.
- Portnoy, J. Modifications of the Rapid Plasma Reagin (RPR) Card Test for Syphilis, for Use in Large Scale Testing. *Amer. J. Clin. Pathol.* 40: 473-479, 1963.
- Reed, E.L. The Rapid Plasma Reagin (RPR) Card Test for Syphilis as a Routine Screening Procedure. *Public Health Lab.* 23: 95-103, 1965.
- Reed, E.L. The Combined Use of the RPR Card and FTA-Abs Tests in the Serodiagnosis of Syphilis. *Public Health Lab.* 26: 123-134, 1966.
- Tiedemann, J.H. and Mullins, J. The RPR Card Test as a Diagnostic Aid in a Venereal Disease Clinic. *Public Health Lab.* 24: 12-15, 1966.
- Walker, A.N. Rapid Plasma Reagin (RPR) Card Test: A Screening Method for Treponemal Diseases. *Brit. J. Vener. Dis.* 47: 258-262, 1971.

blokk, sa

08185 LLISSA D'AMUNT - BARCELONA - SPAIN

03/96

ANEXO 03

Continuação BLOKIT S.A.

RPR qualitative test in MICROTITER PLATES (flat bottom)

Specimen 50 μ l
 Antigen 1 drop (17 μ l)

- 20 minutes of rotation* -

Read macroscopically under a high intensity incandescent lamp, over a white surface.

*ROTATION: On a mechanical rotator able to circumscribe a 2.0-2.5 cm diameter circle on a horizontal plane. The recommended speed of rotation is 200 ± 50 rpm.

RPR test cualitativo en MICROPLACA (fondo plano)

Muestra 50 μ l
 Antígeno 1 gota (17 μ l)

- 20 minutos de agitación* -

Leer macroscópicamente bajo una lámpara incandescente de luz intensa, sobre una superficie blanca.

*AGITACIÓN: En un agitador mecánico rotatorio que circunscriba un círculo de 2,0-2,5 cm de diámetro en el plano horizontal. La velocidad de rotación recomendada es de 200 ± 50 rpm.

ANEXO 04

BIOLAB

Biolab**SÍFILIS****CARBOTEST VDRL®**

Teste RPR de cardiolipina para o diagnóstico da sífilis.

Catálogo 9215-094

Carbobotest para 100 testes

PRINCÍPIO:

O Carbotest VDRL® é uma suspensão coloidal (tipo VDRL carvão) de cardiolipina, lecitina e colesterol, corada em azul. O Carbotest VDRL® floccula em presença de anticorpos, denominados reaginas, encontrados no soro ou plasma de pacientes com sífilis.

RELATIVO:

Antígeno cardiolipídico VDRL - carvão	Frasco conta-gotas (tampa munida de agulha em aço inoxidável) 1 gota = 10 µl Pronto para uso.
---	---------------------------------------	---

Conservar a 2-8 °C até a data de vencimento indicada na etiqueta da caixa. Não congelar.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO:

- Placa escavada.
- Agitador tipo Kline, com capacidade para 180 rotações/minuto.
- Pipeta semi-automática de 50 µl.
- Microscópio com objetiva de 10x ou de 40x.

AMOSTRA:

- Soro ou plasma. Não é necessário inativar.

PROCEDIMENTO QUALITATIVO PARA SORO OU PLASMA:

- 1 - Transferir 50 µl de cada amostra para cavidades da placa de Kline. Recomendamos realizar o teste com amostras puras e diluídas a 1/10 em solução fisiológica (NaCl 0,85%) para evitar eventuais fenômenos de pró-zona.
- 2 - Adicionar 1 gota do antígeno Carbotest VDRL®, utilizando o conta-gotas que acompanha o kit.
- 3 - Agitar imediatamente as placas em agitador tipo Kline por exatamente 6 minutos a 180 rpm.
- 4 - Proceder à leitura, imediatamente, em microscópio com objetiva 10x e ocular 10x.

RESULTADOS:

Reação Negativa	: Observam-se partículas finas e bem dispersas.
Reação Positiva +	: Algumas partículas em pequenos agregados.
Reação Positiva ++	: Pequenos flocos, já perceptíveis a olho nu.
Reação Positiva +++	: Flocos de tamanho médio.
Reação Positiva ++++	: Flocos de tamanho grande.

PROCEDIMENTO QUANTITATIVO PARA SORO OU PLASMA:

- 1 - Transferir 50 µl de solução fisiológica 0,85% para cavidades da placa de Kline.
- 2 - Adicionar 50 µl da amostra a ser titulada à 1.ª cavidade, misturar e transferir 50 µl para a 2.ª cavidade, e assim por diante até a 6.ª cavidade, desprezando 50 µl desta diluição. Obtém-se desta maneira diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64.
Se necessário, as amostras podem ser testadas em maiores diluições, segundo o mesmo procedimento.
- 3 - Adicionar 1 gota do antígeno Carbotest VDRL® a cada diluição da amostra, utilizando o conta-gotas que acompanha o kit.
- 4 - Agitar imediatamente as placas em agitador de Kline, por exatamente 6 minutos a 180 rpm.
- 5 - Proceder imediatamente a leitura como indicado no teste qualitativo.
Considerar como título a maior diluição da amostra que ainda apresente flocculação.

08/94

FLOCULAÇÃO

SÍFILIS**INTERPRETAÇÃO:**

Os testes lipídicos no soro ou plasma, como o teste do VDRL, mostram-se reagentes na sífilis primária, com índices crescentes de positividade, que atingem valores de 100% na sífilis secundária e nas formas recorrentes, caindo para 70 e 80% nas formas tardias. A especificidade, elevada na população "normal", como de doadores de sangue (98 a 99%), apresenta-se limitada, com resultados "falso-positivos biológicos", em diferentes circunstâncias, por vezes transitórias, outras vezes mais persistentes:

Os falso-positivos biológicos "agudos", que desaparecem no máximo ao fim de 6 meses, são observados em infecções agudas bacterianas, parasitárias ou virais, na gripe e após estímulos antígenicos, como vacinações.

Os falso-positivos biológicos "crônicos", que por definição estão presentes por mais de 6 meses, não são permanentes: observam-se em doenças do colágeno, Hanseníase, viciados em drogas e, eventualmente, em pacientes idosos.

Deste modo, os resultados positivos dos testes lipídicos, especialmente na ausência de evidências clínicas ou epidemiológicas de sífilis, devem ser confirmados pelas reações que utilizam antígenos de *T. pallidum*. Ex: IMUNOFLUORESCÊNCIA (IMUNOPALITM1490 cód. 022.006). Para acompanhamento terapêutico da sífilis, os testes lipídicos são os indicados.

No líquido cefalorraquidiano a positividade do teste de VDRL é indicadora de produção intratecal de reações, observada na neurosífilis.

"RECOMENDAMOS, ANTES DA UTILIZAÇÃO DESTES PRODUTOS, A CONFIRMAÇÃO DE SUA VALIDADE COM PADRÕES OU CONTROLES PRÓPRIOS, DE ACORDO COM AS SUAS NORMAS DE CONDUTA TÉCNICA LABORATORIAL".

BIBLIOGRAFIA:

- 1 - WALKER, A. - *Bull. J. Ver. Dis.* - 47: 239-242, 1971.
- 2 - PARIS-HAMELIN, A., VAUSMAN, A., HAKONOFFER, S. - *Le phlegme et la syphilis* - Paris, Masson, 1962.
- 3 - MALEVILLE, J., GONZALEZ, M., THOIFFER, L. - *Bordeaux médical* 18: 343-346, 1962.

Produzido por:	Diagast Laboratoires
DIAGAST s.a.r.l. - 59, rue de Trévise - B.P. 2034 - 59014 LILLE Cedex - France ☎ (33) 20 52 68 00 - Télex DIAGAST 160716 F - Fax (33) 20 52 06 10	
Distribuído por:	Biolab Diagnóstica S.A.
Endereço:	Estrada do Mapui, 491 - Jacarepagua - RJ
Data de fabricação, Prazo de validade e Nº do lote	Vide Caixa
Nº do Registro de M.S.	Vide Caixa
Responsável Técnico	Ana Maria Lissaldo
C.R.F. RJ	5746

ANEXO 05

CECON

ANTÍGENO PARA REAÇÃO DE VDRL - CECON
PRONTO PARA USO

Suspensão antigênica de *Cardiolipina* extraída da coração de boi, com *Lecitina* purificada e *Caseína*, estabilizada, padronizada segundo as normas da OMS (Organização Mundial de Saúde) para a reação de fixação de VDRL.

Quando em contato com reagente (anticorpos) presentes em títulos biológicos de indivíduos infectados por *T. pallidum*, especialmente sangue e LCR (Líquido Cefalo Raquidiano), a suspensão fixa-se visivelmente.

APRESENTAÇÃO E CONSERVAÇÃO

O Antígeno estabilizado para reação de VDRL - CECON é apresentado em caixas contendo 2 frascos de 5ml de antígeno, pronto para uso, autoclavado para 100 testes qualitativos. O antígeno deve ser conservado em geladeira (2-8°C).

REAÇÃO DE VDRL QUALITATIVA NO SORO

Os séros devem estar aquecidos, e não há necessidade de serem esterilizados. Pipetar 0,05ml (50µl) do soro numa escarificação da placa especial para VDRL. O antígeno deve estar na temperatura ambiente (20-28°C). Agitar suavemente o frasco da suspensão de antígeno. Juntar 1 gota (aprox. 20µl) da suspensão do antígeno estabilizado de VDRL - CECON.

Agitar com movimentos rotacionais por 4 minutos em agitador mecânico ou manualmente e ler a fixação a olho nu. Se não houver fixação fazer a confirmação ao microscópio utilizando um aumento de 100 vezes e comparando com um controle negativo.

INTERPRETAÇÃO

Fixação Grupos	Reação Positiva +++
Fixação Média	Reação Positiva ++
Fixação Fraca	Reação Positiva +
Fixação Muito Fraca	Reação Positiva .
Ausência de Fixação	Reação Negativa

REAÇÃO QUANTITATIVA NO SORO

Teste quantitativo poderá ser feito, utilizando-se diluições do soro (1:2, 1:4, 1:8, etc.) em solução fisiológica e nel qual-se lerá como teste a reação qualitativa. Assim será considerado como título do soro a maior diluição capaz de apresentar fixação do antígeno.

REAÇÃO QUALITATIVA EM LCR (LÍQUIDO CEFALO RAQUIDIANO)

Adicionar 1 parte de LCR 10% a 1 parte da suspensão do antígeno estabilizado de VDRL - CECON.

Deixar em repouso por 5 minutos antes de ler e não ler antes de 2 horas.

O LCR deve ser sempre centrifugado mas não é necessário sua inativação.

Pipetar 0,05ml de LCR numa escarificação da placa especial para VDRL e juntar 0,02ml de suspensão do antígeno estabilizado de VDRL - CECON. Agitar com movimento rotacional por 5 minutos e ler a fixação como no teste qualitativo em soro.

Continuação **ANEXO 05**
CECON

INTERPRETAÇÃO

Flocos definidos: Reação positiva
Ausência de flocos: Reação negativa

TESTE QUANTITATIVO EM LCR

Poderá ser utilizado fazendo-se diluições de LCR de 1:2 até 1:256 e repetir o procedimento de teste qualitativo com estas diluições. Nesse caso o resultado será dado de acordo com a maior diluição de LCR que produziu flocação.

OBSERVAÇÕES

Certo é descrito na literatura existem situações diversas em que ocorre falso-positividade no teste de VDRL, sendo sua especificidade de aproximadamente 95 e 98%. Falso-positivos biológicos "agudos" - ocorrem em infecções agudas bacterianas, parasitárias ou virais, em grávidas e após outros estímulos antagênicos. Desaparecem no máximo em 6 meses.

Falso-positivos biológicos "crônicos" - ocorrem em doenças como hemorróias e doenças do colágeno, assim como em violações em drogas ou eventualmente em idosos. Estes resultados serão presentes por mais de 6 meses ou são permanentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moura, Roberto A.A. - Técnicas de Laboratório, Atheneu, 1977.
2. Grubwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis - Grubwohl and Jarrat, Mosby Co., 1980.
3. Lima, Oliveira, Silva, Dias - Imunologia, Imunopatologia, Alergia, Métodos, Guanabara Koogan, 1970.
4. Lima, Soares, Grace, Gelizzi, Campello - Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica, Guanabara Koogan, 1992.

Farmacêutico Responsável: Dra. Nêscia Balsa Karasawa - CRF-6 nº 8578.

REGISTRO NO M.S. nº 1000080907

USO EXCLUSIVO EM LABORATÓRIO

CECON - Centro de Controle e Padrões para Diagnósticos Ltda.
Rua Marquês, 84 - Fone (011) 843-6211 - Fax (011) 843-4384
CEP 05825-150 - Vila Sonia - São Paulo - SP. - Brasil
Indústria Brasileira C.I.C. nº 44.273.637/0001-52

CECON - 5000 - Ago/96

ANEXO 06

DOLES

doles
reagentes

VDRL ESTABILIZADO

V.D.R.L. (Venereal Disease Research Laboratory) é um teste desenvolvido e padronizado pelo Serviço de Saúde Pública Norte-Americano com a finalidade de detectar reações da sífilis no soro, plasma e líquido cefalorraquidiano. Foi adotado como padrão pela Organização Mundial de Saúde.

PARTICULARIDADES DO MÉTODO

V.D.R.L. estabilizado Doles é uma solução alcoólica de colesterol, cardiolipina bovina e lecitina, que ajustados produzem uma reatividade padronizada e constante. O tempo utilizado para suspensão da solução, à base de fosfatos, contém estabilizantes que permitem o uso por um período de 10 meses, desde que seguidas as observações incluídas na presente bula. Salienta-se que a estabilidade da suspensão dos reagentes tradicionais é de 24hs. A inatividade das amostras é desnecessária.

PREPARO DA SUSPENSÃO ANTIGÊNICA

- 1 - Utilizar, preferencialmente, frasco de fundo chato e tampa de vidro com capacidade de 20 a 30 ml.
- 2 - Depositar no fundo do frasco 0,4ml do tampão.
- 3 - Adicionar 0,4ml de VDRL, gota a gota, agitando o frasco em movimentos circulares sobre uma superfície plana. Descrever um círculo de aproximadamente 5cm, diluindo todo antígeno em aproximadamente 5 segundos. Continuar os movimentos circulares por mais 10 segundos. O antígeno (0,4ml) deve ser adicionado com uma pipeta graduada de 0,5 ou 1,0ml e o volume, medido a partir da ponta da pipeta.
- 4 - Adicionar ao frasco 3,2ml do tampão, deixando que escorra pelas bordas.
- 5 - Fechar o frasco e agitar em movimentos verticais durante 10 segundos (30 agitações aproximadamente).
- 6 - Após um repouso de 30 minutos a suspensão antigênica está pronta para uso;
- 7 - Mantido sob refrigeração (2-8°C) o reagente permanece estável por um período de 10 meses, mantendo-se constantes os aspectos morfológicos da suspensão.

AMOSTRAS

Soro, plasma, líquido cefalorraquidiano. As amostras devem ser límpidas e isentas de fragmentos de coágulo. Não há necessidade de inativação do soro.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

A suspensão antigênica deve estar à temperatura ambiente (23-29°) no momento de uso e deve ser homogeneizada por

inversão contínua do frasco durante 2 minutos.

TESTE QUALITATIVO

Pipetar em lâmina escavada:

Amostra(s), controle(s)	50µl
VDRL suspensão	20µl

Agitar a lâmina escavada por 5 minutos em agitador de Kline, ou 8 minutos, manualmente, através de movimentos rotatórios. Examinar no microscópio, em 100X, imediatamente após agitação.

RESULTADOS

Negativo: não há floculação. A suspensão é de aspecto homogêneo.

Positivo: presença de floculação, com a formação de grumos de tamanhos variáveis. A suspensão é de aspecto heterogêneo.

TESTE SEMI-QUANTITATIVO

Pipetar em cada cavidade de lâmina escavada 50µl de solução fisiológica e 50µl da amostra a titular na escavação nº 1. Homogeneizar, transferir 50µl da cavidade 1ª à 2ª e assim sucessivamente até a 6ª escavação. Desprezar os 50µl em excesso da última escavação.

Escavação nº:	1	2	3	4	5	6
Diluição:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64

Adicionar a cada cavidade 20µl da suspensão antigênica e proceder como no teste qualitativo.

RESULTADO

Considera-se como título a maior diluição da amostra em que ocorreu floculação.

Proceder com o líquido cefalorraquidiano de maneira idêntica ao soro, observando a seguinte exceção: a suspensão antigênica deve ser diluída 1:2 com solução fisiológica (partes iguais do VDRL estabilizado e solução fisiológica).

OBSERVAÇÕES

- 1 - A suspensão antigênica deve estar à temperatura de 23-29°C no momento de uso. A reatividade da prova diminui em temperaturas baixas e aumenta em

Continuação **ANEXO 06**
DOLES

temperaturas acima de 30°C.

- 2- No momento de usar, a suspensão antigênica deve ser homogeneizada por agitação durante 2 minutos.
- 3- Paralelamente às amostras, utilizar sempre controles negativo e positivo.
- 4- A homogeneidade da suspensão pode ser observada substituindo-se as amostras por 5µl de solução fisiológica.

BIBLIOGRAFIA

Manual de reacciones para el diagnostico de la sífilis. Publicación científica nº 311, da Organização Mundial de Saúde, 1975.

APRESENTAÇÃO

Tampão	30ml
VDRL (antígeno)	3,5ml

NÚMERO DE TESTES

O reagente, após preparado, é suficiente para a realização de 1.600 testes.

Farmacêutico responsável:

Wander Cairo Albernaz CRF GO - 644

Elaborado e Fabricado por:

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

CGC.: 01.085.513/0001-05

Rodovia BR-153, Km 1.273, Lt. 7, Chácara Retiro

Cx. Postal: 1.051

CEP: 74.001-970 Goiânia - Goiás - Brasil

Serviço de Atendimento ao Consumidor:

Fone: (062) 800-6433 - DDG

Fax: (062) 800-5961 - DDG

Caixa Postal: 1.051

CEP: 74.001-970 Goiânia - GO - Brasil

Autorização funcionamento: MS nº 1.02318-1

doles Z/FJ

REIMPRESSÃO 1298

VDRL

ANEXO 07**LABORCLIN – RPR CORADO L/B****RPR-CORADO L/B**

CÓD. 04-532

O antígeno RPR-CORADO é empregado para teste rápido na pesquisa de reagentes no plasma (RPR) e no soro não aquecido (USR) para a triagem rápida de anticorpos na sífilis. A emulsão antigênica consiste em uma mistura de cardiolipina, lecitina e colesterol estabilizada e corada.

É de grande valor em banco de sangue como teste de triagem, porque pode ser empregado com plasma ou soro não aquecidos, como um teste simples e rápido de flocculação em lâmina, realizado a temperatura ambiente.

Os testes com o antígeno RPR-CORADO são somente uma evidência presuntiva para a sífilis devido haver reações cruzadas. Testes adicionais deverão ser feitos, como será discutido nas indicações do teste.

Essencialmente o teste utilizando o RPR-CORADO consiste nos seguintes passos: Em uma lâmina são misturados soro ou plasma não aquecido, e uma suspensão do antígeno de RPR-CORADO. A mistura é agitada com o auxílio de uma máquina rotatória por um determinado tempo. Durante o tempo de mistura, as partículas de colesterol revestidas de cardiolipina-lecitina, vão floccular na presença de anticorpos tais como as reagentes que estão presentes no soro ou no plasma de indivíduos sífilíticos e ocasionalmente no soro de indivíduos com outras doenças crônicas ou agudas.

Condições de armazenamento: O RPR-CORADO deverá ser guardado entre 2° e 8°C. A quantidade de antígeno suficiente para o dia deverá ser removida do frasco estoque RPR-CORADO guardada no refrigerador e ser transferida para um tubo limpo, permanecendo a temperatura ambiente por 30 minutos antes do uso. O antígeno aquecido que não foi utilizado no dia, deve ser desprezado.

PROCEDIMENTO QUALITATIVO

Deixar que o antígeno e a amostra a ser analisada atinjam a temperatura ambiente. Temperaturas baixas na reação podem fornecer resultados falsos negativos.

- 1) Colocar 50 microlitros da amostra no centro de cada círculo do cartão teste.
- 2) Homogeneizar o frasco do reagente RPR Corado imediatamente antes do uso.
- 3) Pipetar 20 microlitros do reagente RPR Corado e adicionar sobre a amostra a ser analisada.
- 4) Com a própria ponteira utilizada para a amostra, espalhar a mistura por toda a área delimitada pelo círculo.
- 5) Agitar o cartão de teste com movimentos rotatórios (100 rpm) por oito minutos em agitador de Kline ou manualmente.
- 6) Interpretar a reação imediatamente após o término da agitação.

PROCEDIMENTO SEMI-QUANTITATIVO

Todas as amostras consideradas REATIVAS devem ser analisadas pelo procedimento quantitativo para a determinação do título de anticorpos. Sugere-se que as diluições sejam feitas em tubos, entretanto, as mesmas poderão ser realizadas no cartão como segue:

- 1) No cartão teste, colocar 50 microlitros da solução fisiológica (NaCl 0,85%) em cada um dos seis círculos (de 1 a 6).
- 2) Adicionar 50 microlitros da amostra a ser analisada no primeiro círculo. Misturar por aspiração e transferir 50 microlitros para o círculo seguinte. Repetir esta operação até o sexto círculo e desprezar o último excesso de 50 microlitros.
As diluições correspondentes aos seis círculos são respectivamente: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64.
- 3) Homogeneizar o frasco do reagente RPR CORADO imediatamente antes do uso.
- 4) Pipetar 20 microlitros do reagente sobre as seis amostras diluídas.
- 5) Com a própria ponteira utilizada na diluição das amostras, espalhar as misturas por toda a área delimitada pelos círculos, iniciando a mistura pela última diluição.
- 6) Agitar o cartão de teste com movimentos rotatórios (100 rpm) por oito minutos em agitador de Kline ou manualmente.
- 7) Interpretar a reação imediatamente após o término da agitação.

LÍQUIDO CEFALO RAQUIDIANO (LCR)

- 1) Centrifugar e decantar a amostra do LCR. As amostras visivelmente contaminadas com sangue, não são adequadas para o teste (risco de contaminação com plasma do paciente).
- 2) Para a reação com LCR, o reagente RPR-CORADO deverá ser diluído a 1:2 (1 volume do reagente e 1 volume de solução fisiológica).
- 3) O volume de LCR necessário para o teste é de 50 microlitros.
- 4) As demais etapas do teste são as mesmas efetuadas para o soro ou plasma.

Continuação **ANEXO 07**
LABORCLIN – RPR CORADO L/B

INTERPRETAÇÕES

AMOSTRA REAGENTE: Observa-se a formação de aglomerados do antígeno corado macroscopicamente visíveis.

AMOSTRA NÃO REAGENTE: Observa-se uma mistura homogênea (amostra e reagente) sem aglomerados macroscopicamente visíveis.

OBSERVAÇÃO: No teste semi-quantitativo (titulação) considera-se o título de anticorpos a maior diluição da amostra reagente que apresente a formação de aglomerados macroscopicamente visíveis com o antígeno corado. Observa-se deposição do corante no centro da lâmina, formando um ponto em casos negativos.

LISTA DE OBSERVAÇÕES

Verifique esta lista para obter melhores resultados.

- 1) Ajuste a velocidade da máquina para dar a velocidade descrita e esporadicamente verifique-a durante o teste.
- 2) Misture bem o antígeno do RPR-CORADO antes de utilizá-lo no teste, invertendo o frasco várias vezes.
- 3) Efetue a técnica utilizando o antígeno RPR-CORADO em lâmina dentro da temperatura de 23° a 28°C.
- 4) Utilize lâminas limpas, as quais permitem o soro cobrir toda a superfície das mesmas. O soro poderá ser espalhado com o auxílio da ponta da pipeta do soro.
- 5) Evite a evaporação da mistura antígeno-soro, durante a reação, em um clima seco, cobrindo as lâminas com uma câmara úmida.
- 6) Para a melhor visualização da reação use somente cartões para teste branco do kit.
- 7) O kit possui controles com soro reagente e não reagente.

Para a correta interpretação do teste, o antígeno RPR-CORADO deve formar grupos macroscopicamente visíveis com controle reagente e não formar grupos com o controle não reagente.

LIMITAÇÕES DO TESTE

O antígeno RPR-CORADO para o teste, não é específico para a sífilis. Todos os soros ou plasma que apresentarem positividade, deverão ser submetidos a outros testes sorológicos, incluindo a quantificação se indicado. Outros testes sorológicos tais como o FTA-ABS²³. Utilizar FTA SORBENT (LB 04-550); IgG-FITC (LB 04-560); PBS BUFFER (LB 05-750). Testes positivos obtidos com o antígeno RPR-CORADO não deverão ser considerados como evidência conclusiva de que o paciente tenha sífilis.

Reduplicamente, um teste não reativo com o antígeno RPR-CORADO não exclui o diagnóstico da sífilis.

O antígeno RPR-CORADO não deverá entrar em contato com materiais de borracha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PORTNOY, J: Modifications of the Rapid Plasma Reagin (RPR) Card Test for syphilis for use large scale testing. Am. J. Clin. Path., 40:473-479, 1963.
2. FALCONE, V.H., et al: Evolution of Rapid Plasma Reagin (Circle) Card Test. Pub. Health Rep., 79:401-495, 1964.
3. PORTNOY, J: A note on the performance of modifications of the Plasma Reagin (RPR) Card Test for syphilis for use in large scale testing Pub. Lab., 23:43 1965.
4. LARSEN, S.A., et al: A Manual of Tests for Syphilis. American Public Health Association 1950.

LABORCLIN
Produtos para Laboratórios Ltda.

Serviço de
Assessoria ao
Cliente

TELEX
9(041)366-2727

Hua Cassimiro da Azeite, 521
Fonofax: (041) 398-2727 - Caixa Postal 1021
CEP 03321-210 - Pinhal - Paraná
CDD 06.819.113/0031-21 - Inscr. Est. 137/00129-26
Reg. 015 133 973 10042
Resp. Tén. Flávia L. Lemos - CRF 3 43 1

ANEXO 08
SANOFI / PASTEUR

code 52675

PASTEUR V.D.R.L. - LATEX

SYPHILIS SEROLOGICAL DIAGNOSIS
 ready to use antigen for microagglutination
 on slide

DIAGNOSTICS **Pasteur**

2 x 3 ml vials

PRINCIPLE

PASTEUR V.D.R.L. - LATEX is a stable and ready to use ready to use V.D.R.L. antigen associated with latex, which allows rapid microagglutination reactions in solution on slide from plasma or serum fresh or decompartmented, for screening (qualitative reaction) or for syphilis diagnosis (quantitative reaction).

REAGENTS AND STABILITY

PASTEUR V.D.R.L. - LATEX (code 52675)
 ready to use : 2 x 3 ml vials
 stability : at + 2°C - + 8°C until the expiration date printed on the package.
 - Control sera - code 76751 positive syphilis serum control serum; 4 x 1 ml
 - code 52680 positive syphilis rabbit control serum; 1 ml

MATERIAL AND SUBSIDIARY REAGENTS

- Saline (NaCl 0.9%)
 - Calibrated dropper (in package) (1 drop = 12.5 µl)
 - Kine plaque
 - Kine agitator
 - Microscope

SAMPLES

Plasma or serum, fresh or decompartmented.

GEBRAUCHSANWEISUNG

- 1) Vor dem Ausfüllen der Reaktionskammer die Flasche ca. 10 Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.
- 2) Vor Gebrauch und im Laufe der Verteilung die Flasche schütteln.
 Hinweis : Der metallische Tropfenzähler darf nach der Verwendung mit keinem Fall im Kontakt mit der V.D.R.L. - LATEX - Suspension gelassen werden. Die beiden Tropfen entfernen, um das Trocknen zu vermeiden.

A - Qualitative Reaktion

(Aufspüren)
 Auf eine Kinesche
 Platte ablesen :

	1. Verteilung Kontroll- antigen	2. Verteilung titriertes positives Serum	3.-24. Verteilung Serum oder Plasma der Patienten
Serum oder Plasma titriertes positives Syphilis serum	—	—	30 µl
Physiologische Kochsalzlösung	30 µl	—	—
V.D.R.L. - Latex Pasteur (mit dem kalibrierten Tropfenzähler)	1 Tropfen	1 Tropfen	1 Tropfen

Auf dem Kineschen Sichtfeldapparat 6 Minuten schütteln.
 Unmittelbar mit bloßem Auge und/oder im Mikroskop ablesen.
 Lesung und Beurteilung der qualitativen Reaktionen (n = Zahl)

- positive Reaktion : Latexpartikel in Haufen nach der Intensität der Agglutination notieren : +, ++, +++, +++++.
- negative Reaktion : die Latexpartikel sind gleichmäßig verteilt.

B - Quantitative Reaktion (Diagnose)

Mit dem titrierten positiven Kontrollserum und dem Plasma oder Serum der Patienten die Verdünnungsreihen zu 2 in der physiologischen Kochsalzlösung zubereiten (z.B. : von 1/2 bis 1/128).
 Die Reaktion mit jeder dieser Verdünnungen (wie für die qualitative Reaktion) ausführen.
 Die höchste Verdünnung die noch eine positive Reaktion (1 +) für das titrierte positive Serum und für das Serum oder das Plasma der Patienten ergibt, notieren.
 Für das titrierte positive Serum soll diese Verdünnung nicht mehr als eine Verdünnung von der, die auf dem Etikett der Flasche oder auf der technischen Karte vermerkt ist, entfernt sein.

DIAGNOSTICS PASTEUR

3, bd Raymond Poincaré - B.P. 3
 92430 Marnes-la-coquette - Frankreich
 Fernruf : (1) 47.41.79.33 - Fernschreiber : 200 464 F

ANEXO 09**TRILAB DIAGNÓSTICA LTDA**

Trilab Diagnóstica Ltda
 Av. Dr. Cardoso de Melo, 244
 CEP 04548-001 S. Paulo SP
 Telefone/Fax (011) 866 0766

VD TESTE TRILAB

Suspensão Estabilizada Pronta para Uso para a Triagem Sorológica da Sífilis em Amostras de Soro, Plasma e LCR Humanos

FINALIDADE DO PRODUTO

VD TESTE TRILAB é uma suspensão estabilizada, pronta para uso, para a triagem sorológica da sífilis, pela detecção de reagentes, em amostras de soro, plasma e LCR humanos.

APLICAÇÕES CLÍNICAS

A Sífilis é uma doença sexualmente transmissível, congênita e transmitida também através de transfusões sanguíneas. O agente etiológico da sífilis é o *Treponema pallidum*, espiroqueta que produz lesões tegumentares nos órgãos genitais e também em outros órgãos e aparelhos, principalmente os sistemas nervoso e cardiovascular.

Imediatamente após a infecção, o *Treponema pallidum* invade o organismo através da circulação linfática e sanguínea; o período que decorre entre a infecção e o aparecimento da lesão inicial depende do número de treponemas, de sua virulência e da resistência do indivíduo. Esta lesão inicial, chamada cancro sífilítico, regride espontaneamente em três a quatro semanas. As lesões do período secundário, que surgem cerca de seis semanas após o aparecimento do cancro, também entram em regressão espontânea em 4 a 12 semanas. Ao aparecimento das lesões do secundarismo, segue-se um período de latência que, em 75% dos doentes, permanecerá por toda a vida. Nos restantes, 5 a 10% desenvolverão sífilis nervosa, 5 a 10% virão a ter sífilis cardiovascular e em cerca de 10% aparecerão as lesões cutâneo-mucosas terciárias, cu tardias.

O diagnóstico laboratorial da sífilis é feito pela pesquisa direta do treponema (campo escuro), pelas reações sorológicas com antígenos treponêmicos (Imunofluorescência Indireta, Hemaglutinação Passiva e ELISA) e não-treponêmicos (VDRL, USR). Os testes não treponêmicos utilizados atualmente são testes de floculação; o antígeno básico utilizado contém uma suspensão de cardiolipina, colesterol e lecitina estabilizada, e é utilizado para testes de triagem e observação na resposta de pacientes em tratamento.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

VDRL (VENERAL DISEASE RESEARCH LABORATORY) é o teste de triagem padronizado pelo serviço de Saúde Pública Norte-Americano através do CDC (Center for Disease Control) e adotado como padrão pela Organização Mundial da Saúde, para triagem de "reagentes" da sífilis no soro, plasma e LCR. O teste baseia-se na pesquisa de anticorpos anti-cardiolipina produzidos em resposta aos lipídeos que constituem a superfície celular dos treponemas. Atualmente a Organização Mundial da Saúde estabelece como preparação referência a emulsão antigênica estabilizada (reagente pronto para uso - USR), como alternativa aos reagentes anteriormente existentes, em que a preparação da emulsão era prévia ao uso. Este procedimento tem como principal objetivo minimizar a heterogeneidade dos resultados obtidos (baixa reprodutibilidade) com emulsões preparadas no momento do uso, e evitar perdas desnecessárias de reagentes. Algumas características das emulsões antigênicas estabilizadas (reagente pronto para uso - USR), como a sua prolongada estabilidade (1 ano em geladeira), o uso de amostras sem inativação (dispensa inativação por 30 minutos a 56°C) e a sua boa reprodutibilidade, em apenas um reagente, permitem a sua utilização de uma forma rápida, simples e mais segura, em relação às outras emulsões.

O reagente VDTESTE TRILAB (pronto para uso), é preparado segundo os critérios recomendados pela O.M.S., caracterizando-se assim como emulsão antigênica estabilizada pronta para uso, apresentando todas as características deste tipo de preparação.

Continuação **ANEXO 09**
TRILAB DIAGNÓSTICA LTDA

REAGENTES FORNECIDOS COM O PRODUTO

- 1 ou 2 frascos contendo 4.2 ml de Suspensão Antigénica Estabilizada, constituída de Colesterol 0.9%, Cardiolipina 0.03% e Lecitina em concentrações otimizadas que conferem visualização e sensibilidade ideais. Pronta para uso.
- 1 frasco contendo 0.5 ml de Controle Positivo Liofilizado, produzido em coelhos, e azida de sódio 0.1% como preservativo. Reconstituir o frasco com 0.5 ml de água destilada ou deionizada

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

- Placas escavadas ou lâminas de vidro para a reação de floculação
- Água destilada ou deionizada
- Pipetas de precisão : 50 µl e 20 µl
- Pontetas plásticas descartáveis
- Solução Fisiológica
- Agitador Kline (180 rpm)

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DO PRODUTO

Os reagentes deverão ser conservados entre 2 - 8°C. Não expor o reagente ao calor sol ou luz intensa durante o manuseio. É aconselhável que antes do uso os reagentes permaneçam à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para a estabilização necessária. A estabilidade dos reagentes, refere-se ao prazo de validade informado no rótulo do componente.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

- Este teste é para uso diagnóstico somente *in vitro*
- Não pipetar os reagentes com a boca. Não fumar, comer ou beber nas áreas onde as amostras ou reagentes do produto são manipulados.
- Utilizar luvas descartáveis para manipular o reagente e as amostras.
- Não utilizar reagentes após o prazo a data de validade.
- O controle positivo contém azida de sódio e devem ser manipulados com cuidados especiais, pois este sal apresenta a tendência de formar azidas metálicas potencialmente explosivas, portanto, o rejeito de eventuais sobras destes materiais em encanamentos de cobre ou chumbo deve ser realizado com água corrente em abundância para evitar riscos.
- O reagente VD TESTE TRILAB deverá ser armazenado em geladeira (2 - 8°C) e antes de ser utilizado deverá readquirir a temperatura ambiente. Deverá ser delicadamente agitado até sua completa homogeneização por tempo não inferior a 2 (dois) minutos e utilizado imediatamente após sua agitação. Antes de efetuar os testes, pipetar num poço de placa 0,050 ml do reagente e observar ao microscópio, com aumento 100X. Se ainda houverem dúvidas quanto ao aspecto homogêneo da suspensão, agitar por mais 2 (dois) minutos.
- Após a rehidratação do controle positivo, recomenda-se congelar o material em alíquotas

AMOSTRA BIOLÓGICA

Recomenda-se a utilização de soro ou plasma frescos, livres de hemólise.

Amostras de L.C.R. deverão ser centrifugadas antes do teste, que deverá ser efetuado com o sobrenadante. As amostras de L.C.R. com aspecto sanguinolento não se prestam a análise (possível contaminação por plasma).

Não é necessária a inativação das amostras a 56°C por 30 minutos.

Após a obtenção das amostras, pode-se conservá-las em congelador (-20°C). Antes do teste, deixar as amostras retomarem a temperatura ambiente e agitá-las vigorosamente.

Amostras de soro ou plasma com turvação aparente deverão ser centrifugadas, e a porção límpida (sobrenadante ou intermediária) deverá ser utilizada.

Plasmas com excesso de oxalato de potássio ou fluoreto de sódio podem interferir nos resultados.

PREPARO DOS REAGENTES

Importante:

Deixar os reagentes e as amostras retomarem a temperatura ambiente, antes do teste. Os melhores resultados são obtidos a temperatura entre 23 e 29°C. A sensibilidade do teste pode se reduzir em ambientes com temperaturas muito baixas, e temperaturas muito elevadas promovem um aumento inespecífico da reatividade. A temperatura ideal é ao redor de 25°C.

Trilab Diagnóstica Ltda
 Av. Dr. Cardoso de Melo, 244
 CEP 04548-001 S. Paulo SP
 Telefone/Fax (011) 866 0766

PROCEDIMENTO

1) Soro ou Plasma:

A - Teste de Triagem (teste qualitativo):

- Utilizando-se uma placa escavada ou lâmina de vidro rigorosamente limpa e seca, depositar em cada cavidade 50 µl das amostras e controle.
- Agitar o frasco de Reagente VDTESTE, delicadamente por dois minutos, imediatamente antes do uso.
- Adicionar diretamente sobre as amostras, 20 µl de reagente VD TESTE.
- Submeter a placa ou lâmina a agitação, em agitador tipo kline, por 4 minutos à 180 rpm (ou manualmente por 8 minutos).
- Examinar imediatamente após o término da agitação, em microscópio ótico com aumento de 100X.

B - Titulação das Amostras (teste semi-quantitativo):

- Todas as amostras selecionadas como reagentes (positivas) pelo teste de triagem deverão ser semi-quantificadas (tituladas) para a correta interpretação do resultado.
- Em uma placa escavada, pipetar 50 µl de solução fisiológica em cada uma de uma série de escavações (de 1 a 6).
- Adicionar 50 µl da amostra a ser titulada, na primeira escavação. Misturar por aspiração e transferir 50 µl para a escavação seguinte. Proceder assim até a sexta escavação e desprezar o excesso (50 µl).
- As diluições correspondentes às seis escavações são respectivamente: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.
- Agitar o frasco do Reagente VD TESTE, delicadamente por dois minutos, imediatamente antes do uso.
- Adicionar diretamente sobre as amostras diluídas, 20 µl de Reagente VD TESTE.
- Submeter a placa ou lâmina a agitação, em agitador tipo kline, por 4 minutos à 180 rpm (ou manualmente por 8 minutos).
- Examinar imediatamente após o término da agitação, em microscópio ótico com aumento 100X.

2) Líquido Céfalo - Raquidiano (LCR)

- Centrifugar e decantar a amostra de L.C.R. As amostras que visualmente apresentarem contaminação com sangue não são adequadas para o teste (risco de contaminação com plasma do paciente).
- Para reação com L.C.R., o reagente V.D. TESTE TRILAB deverá ser diluído a 1:2(1 volume de Reagente VD TESTE TRILAB e 1 volume de solução fisiológica).
- O volume de L.C.R. necessário é de 50 µl.
- As demais etapas do teste são as mesmas efetuadas para soro ou plasma.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Importante: A leitura dos resultados deverá ser feita imediatamente após o término da rotação da placa ou da lâmina.

REAÇÃO POSITIVA. Observa-se a formação de grumos (flóculos) de tamanhos pequenos, médios ou grandes, de acordo com o grau de positividade.

REAÇÃO NEGATIVA. Ausência de grumos. As partículas ficam finamente dispersas, com um aspecto homogêneo.

Observação: Utilizando-se o teste semi-quantitativo (titulação), considera-se como título a maior diluição da amostra em que ocorre um resultado positivo.

As reações anticardiolipina são positivas em quase 100% dos casos de sífilis (3 - 4 semanas após o início do cancro e na sífilis secundária). Na sífilis latente, os anticorpos anticardiolipina estão geralmente presentes, porém na sífilis tardia assintomática as reações padrão à cardiolipina tornam-se negativas, voltando a ser positivas, em 60-80% dos casos, na sífilis terciária.

Continuação **ANEXO 09**
TRILAB DIAGNÓSTICA LTDA

CONTROLE DE QUALIDADE

Sempre utilize a cada ensaio o soro controle positivo fornecido com o produto - ele é a garantia da qualidade do seu teste. Faça sempre um controle do antígeno, utilizando solução fisiológica em lugar do soro. Os testes de amostras com resultados negativos devem apresentar aspecto semelhante ao do controle do antígeno.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- As Amostras de soro, plasma ou líquido, deverão ser recentes e não poderão ter sofrido grandes variações de temperatura (não ter proteínas precipitadas). A inativação do soro ou plasma é dispensável para este teste.
- As pipetas a serem utilizadas deverão ser preferencialmente semi-automáticas e periodicamente ajustadas. Quanto às ponteiros, aconselha-se o uso de material descartável.
- A placa escavada deverá ser bem limpa, sem ranhuras e isenta de algodão ou papel. A lavagem da placa deverá ser feita com água destilada. Deixar secar em estufa a 37°C na posição vertical. Não enxugar com papel ou tecido.
- A leitura dos testes deverá ser efetuada imediatamente após o término da agitação da placa, sempre com auxílio do microscópio, com aumento de 100X e na região mais central do poço.
- Fenômeno de prozona são ocasionalmente observados. Geralmente as amostras que promovem este tipo de problema, apresentam um resultado duvidoso quando submetidas ao teste sem diluição. Recomendamos, nestes casos, repetir o teste titulando a amostra. Se houver realmente o fenômeno de prozona, as reações com soro diluído deverão apresentar uma visualização bem definida, a partir das primeiras diluições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Duncan, W.P. Am. J. Clin. Pathol. 35:93, 1961.
- Harris, A.J. Vener. Dis. Inform. 27:169, 1946.
- Larsen, S.A. A Manual of Tests for Syphilis, American Public Health Association, 8th edition, Washington DC, 1990.

Produzido por TRILAB DIAGNÓSTICA LTDA
Av. Dr. Cardoso de Melo, 244
CEP 04548-001-São Paulo-SP
CGC/MF - 48.926.315/0001-90
REG MS - 10003020019

ATENDIMENTO AO CLIENTE

Para quaisquer esclarecimentos e sugestões, comunique-se com nosso Departamento de Assessoria Técnica através do Fone/Fax : (011) 866-0766

ANEXO 10

WAMA DIAGNÓSTICA

VDRL/Sífilis

Kit para determinação de anticorpos (reaginas) no soro ou plasma por floculação, para diagnóstico da sífilis.

COD. 55250-F : 5 ml

COD. 55500-F : 10 ml

WAMA diagnóstica

Rua Rui Barbosa, 1077 - Fone: (016) 272-7711 - Fax: (016) 272-6468
CEP: 13560-330 - São Carlos - SP

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A sífilis é uma doença infecciosa humana produzida por um espiroqueta, o *Treponema pallidum*. É a principalmente uma doença transmitida sexualmente. Outras possíveis vias de transmissão são a transfusão de sangue infectado, hoje praticamente eliminada através de triagem sorológica de rotina, e a perinatal, sífilis congênita transmitida in útero pelos treponemas procedentes da mãe infectada para o feto em desenvolvimento.

Clinicamente, após um período de incubação que varia de 10 a 90 dias, pós a inversamente relacionado com a quantidade do inoculado, ocorre, em 85% dos pacientes, o surgimento do cancro, que é uma lesão solitária e indolor, caracterizando a sífilis primária. Aproximadamente 4 a 10 semanas após o aparecimento do cancro surgem frequentemente sintomas como perda de peso, cefaleia, anorexia, mialgia, artralgia, mal-estar, febre baixa, linfadenopatia generalizada e exantema (presente em 75 a 100% dos casos) o que caracteriza a sífilis secundária. Podem ocorrer também neste estágio manifestações de comprometimento do sistema nervoso central. Após as manifestações primárias ou secundárias ocorre o período conhecido como sífilis latente, caracterizado por testes sorológicos positivos e ausência de achados clínicos. Pode ter duração de 1 ou 2 anos. Sem tratamento, cerca de uma terça dos pacientes apresenta sífilis terciária, que pode manifestar-se como goma (15%), sífilis cardiovascular (10%) ou neurosífilis (8 a 10%).

Os testes sorológicos para sífilis são classificados como não treponêmicos, usados mais comumente para a triagem, como o VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) e o RPR (Rapid Plasma Reagin), e treponêmicos, usados como testes confirmatórios para os soros reativos nos testes de triagem, como o TPHA (Treponema pallidum Hemagglutination) e o FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody - Absorption).

O VDRL de WAMA é um teste de flocação, não treponêmico, para diagnóstico de sífilis através da pesquisa de anticorpos (reaginas) no soro ou no plasma, com a grande vantagem sobre o VDRL clássico por consistir de uma suspensão estabilizada e pronta para uso.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Quando a suspensão antigênica do VDRL é misturada com o soro ou o plasma que contenham anticorpos (reaginas), as partículas de antígeno floculam e o resultado da reação é observado ao microscópio. A ausência de flocação indica resultado negativo.

APRESENTAÇÃO DO KIT

COD. 55250-F

Para 250 determinações

1. Suspensão antigênica (5 ml)
2. Instruções para uso

COD. 55500-F

Para 500 determinações

1. Suspensão antigênica (10 ml)
2. Instruções para uso

ESTABILIDADE DO REATIVO

- SUSPENSÃO ANTIGÊNICA (1): deixar à temperatura ambiente antes de utilizá-la. Homogeneizá-la bem antes de usar. Estável entre 2-8°C até a data do vencimento. Não congelar.

AMOSTRAS

Soro ou plasma não inativados. Não usar amostras hemolizadas, contaminadas ou lipêmicas. As amostras podem ser conservadas no máximo 4 a 6 semanas a -20° C.

PROCEDIMENTO

a. Teste Qualitativo

Objetivo: para triagem e eliminação dos soros não reagentes

1. Pipetar 50 µl de soro ou plasma inativados em uma cavidade da lâmina de vidro
2. Pipetar 20 µl da suspensão antigênica homogeneizada na mesma cavidade da amostra a ser testada. Não é necessário misturar esses dois componentes.
3. Agitar a lâmina durante 4 minutos a 180 r.p.m.
4. Imediatamente após os 4 minutos observar ao microscópio

RESULTADO DAS LEITURAS

Reação Negativa : AUSÊNCIA de agregados. Aspecto homogêneo
Reação Fracamente Positiva : PRESENÇA de pequenos agregados dispersos.
Reação Positiva : PRESENÇA de médios e grandes agregados

b. Teste Semi-Quantitativo

1. Fazer diluições da amostra em solução salina a 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, etc.
2. Pipetar 50 µl de cada diluição em cada cavidade da lâmina de vidro
3. Pipetar 20 µl da suspensão antigênica homogeneizada em cada diluição. Não é necessário misturar
4. Agitar a lâmina durante 4 minutos a 180 r.p.m.
5. Imediatamente após os 4 minutos observar ao microscópio

TÍTULO DA AMOSTRA: será o da última diluição onde ainda se visualiza a presença de agregados

INTERPRETAÇÃO

Podem ocorrer reações falso positivas com o VDRL em condições como: imunizações, infecções, gravidez, malária, doença autoimune (lupus eritematoso sistêmico, etc.), doenças malignas, etc.

Se a reação do VDRL der resultado positivo deve-se realizar um teste confirmatório específico para treponema. A WAMA produz e distribui o FTA-Abs (imunofluorescência) e o TPHA (hemaglutinação) para detecção de anticorpos anti-treponemas.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Conservar os reagentes entre 2-8°C. Não congelar.
2. A suspensão antigênica do VDRL contém timerosal a 0.1% como conservante, o qual é tóxico quando ingerido.
3. Não utilizar reativos fora do prazo de validade

Bibliografia

1. Luger, A.: Diagnosis of syphilis. Bul. World Health Org., 59(5): 647, 1981.
2. Taylor, L.C.: Serologic evaluation of syphilis. Bul. Mason Clinic, 33: 131, 1979-80.
3. Fiumara, N.J.: Biologic false-positive VDRL tests. JAMA, 223: 1167, 1973.
4. Seewert Jr., T.W.: Interpreting Serologic Tests for syphilis. AFP, 26(2): 157, 1982.
5. Bryant, N.J.: Serological tests for syphilis. Laboratory Immunology and Serology. W.B. Saunders Company, 1978.

ANEXO 11

WIENER LAB.

V.D.R.L. test

Suspensión antigénica estabilizada para realizar la prueba V.D.R.L. modificada (USR) de detección de sífilis

SIGNIFICACION CLINICA

La sífilis es una de las enfermedades venéreas más antiguamente conocidas. Su agente etiológico, el *Treponema pallidum*, posee la capacidad de invadir las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El contacto sexual es la forma más común de transmisión.

Luego de la invasión, los microorganismos se multiplican y se dispersan rápidamente. La detección y tratamiento de la enfermedad en sus estadíos tempranos es fundamental a fin de evitar complicaciones graves como son la neurosífilis, sífilis cardiovascular y sífilis congénita, producida por la infección transplacentaria del feto en desarrollo.

Los esfuerzos para diagnosticar esta enfermedad sufren la carencia de un método para cultivar los microorganismos en medios de laboratorio y la dificultad para detectar el agente etiológico en estadíos de la enfermedad en los que no se observan lesiones epidérmicas.

Sin embargo, desde el comienzo de la infección aparecen en el suero del individuo infectado ciertas sustancias denominadas "reaginas" que son semejantes a anticuerpos y reaccionan con antígenos de cardiolípina, lecitina y colesterol.

Estas reacciones junto a los signos clínicos son por lo tanto los procedimientos más rápidos y útiles disponibles para diagnóstico de sífilis.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los anticuerpos denominados "reaginas", que se encuentran presentes en individuos infectados por *T. pallidum* se detectan en suero por la reacción con un antígeno cardiolípinico purificado y estabilizado. Si la muestra contiene reagina, ésta se unirá al antígeno produciendo una floculación visible en microscopio. Las reacciones inespecíficas se evitan con el empleo de antígeno altamente purificado y el agregado de cloruro de colina característica de la técnica USR (unheated serum reagin) en la que no es necesario inactivar la muestra.

REACTIVOS PROVISTOS

Antígeno: suspensión acuosa de antígeno de cardiolípina y lecitina purificados, en buffer fosfatos con cloruro de colina y EDTA de acuerdo a las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Cuando se realiza la prueba cuantitativa se requerirá adicionalmente Solución Fisiológica. Si la prueba se realiza empleando líquido cefalorraquídeo como muestra será

necesaria una solución de Cloruro de Sodio 10 g/dl.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El Reactivo Provisto es estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

El Reactivo Provisto se encuentra listo para usar. Agitar previo a la ejecución de la prueba.

PRECAUCIONES

El Reactivo es para uso in vitro.

MATERIAL REQUERIDO

1- Provisto

- 1 gotero

2- No Provisto

- Agitador rotativo ajustable a 180 rpm.
- Placa de vidrio transparente con sectores de 14 mm de diámetro cada una.
- Micropipetas o agujas capaces de medir los volúmenes indicados. Ver PROCEDIMIENTO.
- Microscopio.

MUESTRA

Suero, plasma o líquido cefalorraquídeo (LCR).

a) **Recolección:** obtener suero, plasma o LCR de la manera usual. No inactivar.

b) **Aditivos:** no se requieren para suero o LCR. Si la prueba se realiza con plasma, éste puede obtenerse empleando heparina, EDTA u oxalato de sodio como anticoagulante.

c) **Sustancias Interferentes conocidas:** hemólisis o hiperlipemia puedan ocasionar resultados erróneos.

d) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** de no procesarse de inmediato los sueros pueden conservarse hasta una semana en refrigerador (2-10°C). El plasma puede emplearse hasta 24 horas luego de la extracción.

PROCEDIMIENTO

Tanto los reactivos como la muestra deben estar a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

f) **Prueba cualitativa en placa para suero o plasma.**

Continuación **ANEXO 11**
WIENER LAB.

En cada uno de los sectores delimitados de la placa colocar:

Muestra	50 ul
---------	-------

Con gotero provisto colocar:

Antígeno	1 gota
----------	--------

Agitar horizontalmente la placa a 180 rpm durante 4 minutos. Observar inmediatamente en microscopio con poco aumento (60 a 100 X).

II) Prueba cuantitativa en placa para suero o plasma.

Preparar diluciones de la muestra 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 con solución fisiológica y realizar para cada dilución la prueba como se describe en I.

III) Técnica cualitativa en placa para LCR.

Diluir el Antígeno 1:2 con solución de Cloruro de Sodio 10 g/dl. Emplear dentro de las 2 horas de preparación.

En cada sector delimitado de la placa colocar:

Muestra	50 ul
---------	-------

Con aguja calibre 8 agregar:

Antígeno diluido	1 gota (10 ul)
------------------	----------------

Mezclar bien y agitar horizontalmente la placa durante 8 minutos a 180 rpm.

Leer los resultados en microscopio con poco aumento (60 a 100 X).

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Reactivo: presencia de floculación.

No reactivo: ausencia completa de floculación.

Prueba Cuantitativa: el título estará dado por la inversa de la última dilución que se observe reactiva. Leer atentamente.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

CONTROL DE CALIDAD

Para controlar la calidad del sistema procesar un Control Positivo (suero seguramente reactivo) y un Control Negativo (suero seguramente no reactivo) utilizándolos de la misma forma que las muestras.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Resultados falsamente positivos pueden ser observados en individuos con cuadros patológicos diversos como hepatitis, influenza, brucelosis, lepra, malaria, asma, tuberculosis, cáncer, diabetes y enfermedades autoinmunes.

Estos casos no son muy comunes y generalmente presentan

reacciones con títulos bajos y una historia clínica que no coincide con las características de sífilis.

Es imprescindible por estos motivos ante toda prueba cualitativa reactiva realizar la prueba cuantitativa.

Resultados falsamente negativos pueden observarse cuando se presenta el fenómeno de prozona. Por este motivo se recomienda repetir la prueba, en suero diluido 1:5 con Solución Fisiológica para verificar el resultado. Si en estas condiciones se observa floculación la muestra es reactiva.

A pesar de las ventajas de este método, sus resultados al igual que los de cualquier prueba serológica, sólo constituyen un dato auxiliar de diagnóstico que debe corroborarse con la historia clínica del paciente.

PERFORMANCE

Sobre 2140 muestras de un servicio hospitalario, ensayadas usando V.D.R.L. test e Inmunofluorescencia como método de referencia, se observó una concordancia superior al 95 %.

PRESENTACION

Equipo para 250 determinaciones (Cod 1853151).

BIBLIOGRAFIA

- Manual of Tests for Syphilis, 1969, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga 30333.
- Zinsser Microbiología, Joklik W., Willett H. y Amos D., 17ª edición Editorial Médica Panamericana, 1983.
- Manual of Tests for Syphilis, cap. 8, 1990, American Public Health Association, Washington, D.C 20005
- Podesta, D.; Svetaz, M.J.; Ricomi, R.; Capriotti, G.; Rojkin, L.; Lorenzo, L.; "Evaluación de tres reactivos para detección de sífilis" - VIII Congreso Argentino de Bioquímica, 54ª Triduo Bioquímico Científico Anual 1990 - Revista A.B.A., - Vol. 54 Nº 3 1990.

Wiener lab.

2000 - Rosario - Argentina

U.R. 960924

860232503

Pag. 2 de 2

ANEXO 12

VDRL - BRÁS - LB Produtos para Laboratórios LTDA

VDRL - BRÁS

CÓD. 04-180

(Artigo para a reação de VDRL)

EXPLICAÇÃO DO TESTE

O teste de VDRL, desenvolvido por Haver, Rosenburg e Pódi é capaz de detectar reaginas no soro humano não especificamente associado à infecção sifilítica. Tais reagentes possuem, a seguir, características de alta, provas para serem tipos de antígenos em reação humana, antígenos específicos que podem ser detectados por FTA ABS e antígenos não específicos (reagentes) encontrados em detectores de VDRL e RPR.

PRINCÍPIO BIOLÓGICO DO TESTE

O antígeno de VDRL é uma suspensão coloidal de cardiolipina, lecitina e colesterol. Esta suspensão, quando adicionada à solução contendo o soro VDRL, forma uma suspensão de partículas muito finas. Estas partículas coloidais são reagentes que estão presentes no soro humano durante a infecção sifilítica.

A suspensão de reagente com a suspensão antigênica de VDRL, formará grupos de partículas antigênicas que se tornam visíveis ao microscópio. A suspensão das partículas antigênicas dá uma reação positiva de que a reação está presente no soro de pacientes. A ausência da suspensão indica uma reação negativa.

REAGENTES

- 1 - Antígeno de VDRL: Solução coloidal cardiolipina, lecitina e colesterol dissolvidos em álcool etílico absoluto. Armazene e mantenha a solução em CAC (Canto para Canto do Prato). Está disponível em ampolas de vidro, hermeticamente fechadas, e deve ser guardado protegido da luz e em temperatura ambiente (15-20°C). Nesta temperatura, as propriedades do antígeno permanecem em solução. Dissolver as frascos que apresentarem turbidez ou precipitado.
- 2 - Solução tampão para VDRL, pH 6,6 ± 0,1: Checar o pH da solução quando ocorrer uma mudança inapropriada na reatividade do teste. Não usar se apresentar turbidez.

AMOSTRAS

- A - Soro:
 - 1 - Coletar e reagente, pelo menos uma hora após a coleta para evitar a presença do coágulo no soro. Deixar coagular e separar o soro a uma temperatura adequada.
 - 2 - Incubar em banho a 37°C por 30 minutos.
 - 3 - Examinar a solução sob o microscópio e observar a presença de partículas.
 - 4 - Reservar a 5°C por 10 minutos aquelas que apresentarem reação positiva e centrifugar imediatamente.
 - 5 - Todas as amostras devem estar em temperatura ambiente ou serem utilizadas.

- B - Líquido Cefalorraquidiano (LCR):
 - 1 - Coletar o LCR, centrifugar e separar o sobrenadante. O LCR deve ser testado sem centrifugação. Amostras que foram anteriormente conservadas em condições muito baixas não são adequadas ao uso.

MATERIAIS NECESSÁRIOS

- 1 - Agulha medidora: ajustável a 180 graus, clinicamente um círculo de 1 mm de diâmetro sobre um plano horizontal.
 - 2 - Microscópio em uso, para fazer círculos de pesquisa com aproximadamente 1 mm de diâmetro.
 - 3 - Ponto limpo, para leitura de 100 mm.
 - 4 - Agulhas hipodermicas, sem filtro:
 - a - Teste em soro: 18 G
 - b - Teste em LCR: 21 ou 22 G
 - 5 - Líquido de vidro: 50x80 mm, com 12 círculos de pesquisa de aproximadamente 1 mm de diâmetro, para teste no LCR.
- NOTA: Os círculos devem ser limpos e esterilizados para evitar que o material reapareça dentro a agulha.
- 6 - Placa de vidro, 60x80 mm, com concentrações variando de 16 mm de diâmetro a 1,75 mm de profundidade, para teste no LCR.
 - 7 - Solução de vidro: 1 ou 2 ml.
 - 8 - Frasco de vidro com tampa de resina esterilizada, capacidade para 30 ml, fundo chato e com aproximadamente 36 mm de diâmetro.
- NOTA: Frascos com a superfície de fundo côncavo não são adequados para causar a distribuição de soro sobre a superfície.

PREPARO DA SUSPENSÃO ANTIGÊNICA

Preparar uma suspensão antigênica a cada dia de trabalho. A temperatura do soro deve ser de 22-26°C no momento de preparar a suspensão antigênica.

- 1 - Pipetar 0,4 ml de soro tampão para o frasco de vidro.
- 2 - Adicionar 0,5 ml de antígeno (soro de uma pipeta graduada de 1,0 ml) diretamente sobre o soro, agitando a solução com uma agulha esterilizada e inserir sobre uma superfície plana.
- NOTA: O antígeno é adicionado a gota, com uma velocidade de 8 gotas para cada 0,5 ml de soro. A velocidade de adição agitada é de 1 gota (durante o ciclo de frasco e concentrações em círculo de 6 mm de diâmetro, aproximadamente 3 vezes por segundo).
- 3 - Agitar a solução de soro de antígeno da pipeta com uma agulha esterilizada sobre o soro.
- 4 - Continuar a agitação de frasco por 10 segundos.
- 5 - Adicionar 0,1 ml de solução tampão.
- 6 - Fechar o frasco e agitar a solução por 30 vezes em 10 segundos. A suspensão antigênica está pronta para uso e a agitação deve ser feita.
- 7 - Homogeneizar a suspensão antigênica com uma agulha esterilizada. Não homogeneizar a sus-

pensão fazendo-a virar de costas e agitar, pois isso pode causar danos à partícula e à reação de reatividade.

- 8 - Testar a reatividade da suspensão antigênica com soro controle (reagente, reagente negativo e soro reagente).

TESTE DA EXATIDÃO DA AGULHA

- 1 - A exatidão do teste depende da quantidade da suspensão antigênica utilizada. Checar a agulha calibrada cuidadosamente para assegurar a liberação do volume correto de suspensão.
- 2 - Para o teste qualitativo e quantitativo de soro, preparar a suspensão antigênica sobre o soro. 180 mm de soro, completa a uma reação de soro. Esta solução deve ser 0,2 ± 2 gotas de suspensão antigênica (17 gotas) quando utilizada diretamente.
- 3 - Para o teste qualitativo e quantitativo de LCR, preparar a suspensão antigênica sobre o soro. 180 mm de soro, completa a uma reação de soro. Esta solução deve ser 0,2 ± 2 gotas de suspensão antigênica (17 gotas).

PROCEDIMENTO TÉCNICO DO SORO

TESTE QUALITATIVO

- 1 - O teste de reatividade em líquido para soro é realizado pela temperatura de reação. Para uma reação positiva e reprodutível, a temperatura ambiente deve estar entre 22-26°C. Em temperaturas inferiores a reatividade decresce e em temperaturas superiores, a reatividade aumenta.
- 2 - Pipetar 0,05 ml de soro e 0,05 ml de suspensão antigênica sobre o círculo de 1 mm de diâmetro.
- 3 - Homogeneizar a suspensão antigênica.
- 4 - Adicionar 1 gota (17 gotas) da suspensão antigênica a cada círculo de teste.
- 5 - Colocar o líquido sobre o microscópio. Agitar por 4 segundos a 180 x 1 rpm. Quando o líquido estiver bem misturado em cima do círculo, colocar na lâmina que uma célula está sobre a reação para prevenir suspensão excessiva.
- 6 - Ler os resultados imediatamente ao microscópio, usando escala 10x e objetiva 10x.
- 7 - Ler os resultados:

Grupos grandes ou redondos	Reagente
Grupos pequenos	Reagente reagente
Sem grupos ou flocos pequenos	Não reagente
- 8 - O resultado de pró soro é clinicamente observado. Este tipo de reação é observada quando uma amostra ou parte da suspensão antigênica ocorre com o soro da solução a uma reatividade mínima e mínima com o soro (líquido). Esta reação pode ser interpretada como um resultado reagente reagente ou "reagente" não reagente. Não há resultados que podem ser facilmente reagente reagente. Portanto, reagente de que, todos os soro que mostram resultados reagentes reagentes ou "reagente" não reagente não reagente, apenas resultados utilizados no procedimento quantitativo.

TESTE QUANTITATIVO

- Testar quantitativamente em soro (líquido) todos os soro que apresentarem resultados reagentes, reagentes reagente ou "reagente" não reagente no teste qualitativo. As diluições de soro e soro testados são: Não diluído (1:1), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.
- 1 - Colocar 0,05 ml de soro e 0,05 ml de suspensão antigênica sobre o círculo de 1 mm de diâmetro.
 - 2 - Usar uma pipeta adequada, diluir 0,05 ml de soro na solução de 0,05 ml de soro no círculo de 1 mm de diâmetro.
 - 3 - Misturar a solução de soro no círculo de 1 mm de diâmetro.
 - 4 - Transferir 0,05 ml de solução de 1:2 no círculo de 1 mm de diâmetro.
 - 5 - Transferir sucessivamente até o círculo de 1 mm de diâmetro de 1:32.
 - 6 - Processar o teste como descrito no teste qualitativo e preparar a lâmina.
 - 7 - O teste é dado pela mais alta diluição que produz um resultado reagente (ou não reagente reagente).
 - 8 - As lâminas de diluição de soro reagentes reagentes, reagentes reagente e não reagente reagentes, 1:64 de soro em soro adicionando 0,1 ml de soro de 1:64 a 0,7 ml de soro. Misturar e preparar diluições 1:128 e 1:256.

PROCEDIMENTO TÉCNICO DO LCR

- Preparar a suspensão antigênica:
- 1 - Preparar a suspensão antigênica como descrito anteriormente.
 - 2 - Adicionar uma gota de soro 10x a uma gota de suspensão de VDRL.
 - 3 - Homogeneizar suavemente por agitação no líquido de frasco e separar para reação 5 minutos, para 100 mm de 2 horas.
 - 4 - O antígeno adicionado para uso com o LCR é adicionado somente por 2 horas após o preparo.

TESTE QUALITATIVO

- 1 - Pipetar 0,05 ml de LCR na concentração de placa.
- 2 - Adicionar 1 gota (0,01 ml) de suspensão antigênica em cada amostra com a agulha de 21 ou 22 G.
- 3 - Agitar as lâminas por 10 segundos a 180 rpm.
- NOTA: Em lâminas secas, preparar a suspensão antigênica durante a agitação.
- 4 - Preparar as lâminas imediatamente ao microscópio, usando escala 10x e objetiva 10x.
- 5 - Ler os resultados:

Grupos grandes	Reagente
Sem grupos ou flocos pequenos	Não reagente

TESTE QUANTITATIVO

- O teste quantitativo deve ser feito em todos os soro que apresentarem resultados reagentes no teste qualitativo.
- 1 - Preparar as diluições de soro, como descrito para o teste qualitativo.
 - 2 - Preparar o teste como descrito para o teste qualitativo.
 - 3 - O teste é dado pela mais alta diluição que apresentar um resultado reagente.

Continuação **ANEXO 12** LB Produtos para Laboratórios LTDA

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

NO SORO:

- 1 - O teste de VDRL é um auxiliar no diagnóstico de sífilis. Para o diagnóstico de sífilis, devem ser considerados resultados de VDRL com os resultados de outros testes sorológicos: ensaio em cartão rápido, sistemas e ensaio fixos e testes de risco. O valor de um VDRL reagente no diagnóstico sorológico de sífilis aumenta quando combinado a um teste treponêmico reagente, como FTA ABS ou microaglutinação para treponemas de T. pallidum (MHA-TP).
- 2 - Um teste de VDRL reagente indica infecção presente ou passada por um treponema biológico; entretanto, pode ser uma reação falso positiva. Reações falso positivas podem resultar por vários laboratoriais assim como por antígenos não relacionados a reação sífilis. Erros laboratoriais são detectados por um VDRL não reagente na segunda amostra. VDRL falso positivo que resulta de uma infecção com infecção não treponêmica ou outras condições patológicas são descartados por um acompanhamento com teste treponêmico não reagente.
- 3 - Um VDRL não reagente e sem evidências clínicas de sífilis podem indicar infecção não atual ou uma infecção tratada efetivamente. Um VDRL não reagente com evidências clínicas de sífilis pode ser observado em sífilis primária recente e em sífilis secundária consequente ao tratamento de até 2 anos, e em alguns casos de sífilis tardia. Um VDRL não reagente não descarta a possibilidade de uma infecção sífilis em recidiva.
- 4 - Qualquer teste quantitativo é acompanhado em pacientes com sífilis, um aumento no título de 4 vezes em uma nova amostra pode indicar uma infecção, uma reinfeção, ou uma lesão na primeira amostra; um decréscimo no título de 4 vezes em sífilis recente geralmente indica terapia adequada.
- 5 - Todos os testes qualitativos reagentes devem ser titulados. Para testes em um título pode ser encontrado em uma titulação serializada por HIV-1.

Poras vezes um alto título falso positivo pode ser visto em alguns pacientes com leishmanias.

NO LCR:

- 1 - Um resultado VDRL reagente no LCR, livre de sangue ou outros contaminantes, quase sempre indica uma infecção. Músculo paralisado ou gânglios do sistema nervoso central. Um resultado biológico falso positivo para sífilis é raro no LCR.
- 2 - Um teste VDRL não reagente no LCR indica que o paciente não tem sífilis. Entretanto, um resultado negativo pode ocorrer em alguns pacientes com neurosífilis. Reações não específicas no LCR de pacientes com leishmanias podem ocorrer em alguns casos.

VARIAÇÕES ACEITÁVEIS

- 1 - Pode-se preparar o dobro da suspensão antígenoica. Para quantidades menores, preparar volumes antígenoicos e testá-los com soro controle. Fornecer a 100 µl de soro que apresentarem reação satisfatória.
- 2 - Uma agulha calibre (18G) sem bico é o recomendado para dispensar os 17 µl de suspensão antígenoica; entretanto, qualquer dispositivo que dispense 17 µl pode ser utilizado.
- 3 - A mistura planejada para o teste do soro pode ser usada para o LCR.

CAUSA DE ERRO

- 1 - Se a temperatura da área do teste, ambiente, de reagentes estiver em relação de 13°C, a reatividade decresce, se a temperatura estiver acima de 25°C, a reatividade aumenta.
- 2 - Se forrm reações soros heterotizadas, contaminadas ou extremamente turvas, a reatividade do teste não poderá ser verificada.
- 3 - Se o tipo de vidro do preparo da suspensão antígenoica não for rigorosamente estéril, a suspensão não terá a reatividade adequada.
- 4 - Se forrm reações antígenoicas variáveis ou inadequadas, os resultados poderão ser afetados.
- 5 - Se a velocidade e o tempo de reação da mistura amostra-antígeno não forem rigorosamente seguidos, a reatividade poderá ser afetada.
- 6 - Se a suspensão antígenoica for inadequadamente forçada através da seringa e agulha, a suspensão poderá perder a reatividade.
- 7 - O contato da suspensão antígenoica com materiais de borçha (seringa e agulha) dentro da partícula da suspensão, deteriora a reatividade antígenoica.

LIMITAÇÕES DO TESTE

- 1 - Um resultado de pró cura pode ocorrer. Neste caso, a reatividade com soro não deve ser considerada. Neste caso, suspensa-se quando a reação positiva somente um resultado fracamente reagente ou uma "reagente" não reagente no teste qualitativo. Entretanto, todas as amostras que fornecerem tal interpretação devem ser retestadas utilizando-se o procedimento quantitativo. Quando um resultado reagente for obtido numa diluição de soro que produz somente um resultado fracamente reagente ou "reagente" não reagente antes da diluição, repetir o teste como reagente e retestar o soro B.
- 2 - A suspensão antígenoica deve ser preparada diariamente. A suspensão antígenoica estabilizada para o LCR é ativada somente por 2 horas após o preparo.
- 3 - O teste no LCR deve ser realizado somente quando o soro do paciente for reagente ao teste treponêmico.
- 4 - Resultados negativos não são indicados.
- 5 - Reações biológicas falso positivas podem ocorrer com antígenos contendo cardiolipina, principalmente em amostras de pessoas que abusam de drogas, que têm doenças como lupus eritematoso, mononucleose, malária, hepatite, ou que tenham sido recentemente vacinadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Harris A, Rosenberg AA, Riedel LM. A microabsorption test for syphilis using cardiolipin antigen. Preliminary report. J Clin Microbiol 1946;27:143-74.
- 2 - Harris A, Rosenberg AA, del Vecchio ER. The VDRL slide flocculation test for syphilis: II. A supplementary report. J Clin Microbiol 1948;29:72-5.
- 3 - Duncan WP, Bowers HN, Harris A. VDRL slide flocculation test. Am J Clin Pathol 1961;35:23-5.
- 4 - Kober ST, Zlot A, Levan SA, Reynolds GH. Serological response to syphilis treatment: A new analysis of end data. JAMA 1985;253:1296-8.
- 5 - Levan SA, Harris CA, Wolig OH, Kennedy EJ. Cardiolipin flocculation test for syphilis: Treponemal and nontreponemal tests. In: Morison P, Karstad E, eds. Advances in sexually transmitted diseases. Utrecht, The Netherlands: VNU Science Press, 1986:157-62.
- 6 - Manual of Tests for Syphilis, Public Health Service Publication 1980-76-66.

Produtos para Laboratórios LTDA

Rua Cassimiro de Abreu, 521 - Fone: (041) 306-2777
Fax: (041) 267-3346 - Caixa Postal 1021
CEP 83301-210 - Pinhais - Paraná
CGC 76.619.113/0001-31 - Inscr. Est. 137.00129-M
RG M.S. 100.970.10032
Resp. Tec. Elcio H. Uemura - CRF 9-4311