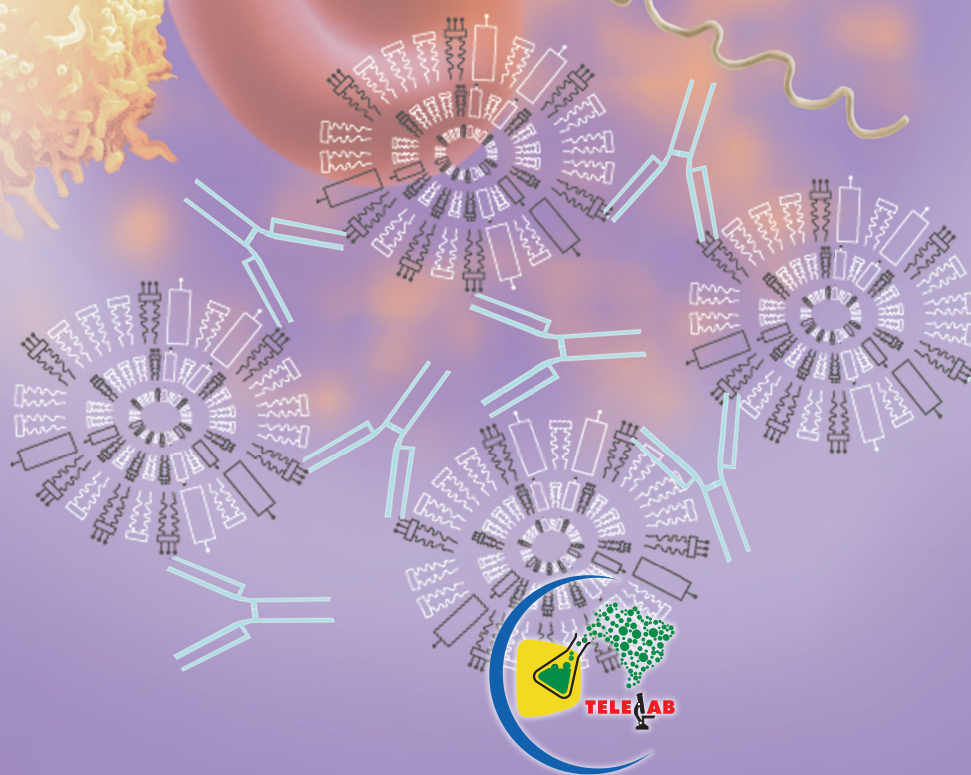


# SÍFILIS

Estratégias para Diagnóstico no Brasil



**Ministério da Saúde**

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

**MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE**

José Gomes Temporão

**SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE**

Gerson Oliveira Penna

**DEPARTAMENTO DE DST, Aids e Hepatites Virais**

Dirceu Bartolomeu Greco

**UNIDADE DE LABORATÓRIO – ULAB**

Lilian Amaral Inocêncio

**COORDENAÇÃO DO TELELAB – ULAB**

Nívea Orém de Oliveira Guedes

Núbia Gonçalves Dias

**COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO DO PROJETO TELELAB 2009/2010**

Maria Luiza Bazzo – UFSC

**AUTORES:**

Elaine Sanae Sumikawa

Leonardo Rapone da Motta

Lilian Amaral Inocêncio

Luiz Alberto Peregrino Ferreira

Maria Luiza Bazzo

Miriam Franchini

Mirthes Ueda

**REVISÃO TÉCNICA**

Neiva Sellan Lopes Gonçalves

**PROJETO GRÁFICO, EDIÇÃO E DIAGRAMAÇÃO**

Virtual Publicidade Ltda.

**DESIGN INSTRUCIONAL**

Luciane Sato

**ILUSTRAÇÕES E FOTOS INÉDITAS**

Maurício Muniz

**FOTOS DOS VÍDEOS**

Projeto Telelab 2009/2010

**TIRAGEM:** 1ª edição – 2010 – 6000 exemplares

É permitida a reprodução parcial ou total desde que citada a fonte.

**PRODUÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E INFORMAÇÕES:**

Ministério da Saúde

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

0800 61 24 36

[www.aids.gov.br/telelab](http://www.aids.gov.br/telelab)

[telelab@aims.gov.br](mailto:telelab@aims.gov.br) ou [telelab.sangue@aims.gov.br](mailto:telelab.sangue@aims.gov.br)



# Apresentação

Seja bem-vindo (a) ao Sistema de Educação a Distância – TELELAB. Os cursos foram elaborados dentro de uma abordagem que favorece a aquisição de conhecimentos e o repensar da prática profissional.

Para o sucesso da aprendizagem e a garantia de um excelente aproveitamento, além de assistir ao vídeo, leia este manual e releia as informações sempre que tiver dúvidas em sua prática diária.

Neste manual **“Sífilis – Estratégias para Diagnóstico no Brasil”** são apresentados aspectos históricos da sífilis e do seu diagnóstico laboratorial, a história natural, seu agente etiológico e os testes utilizados para o diagnóstico laboratorial. São descritos, ainda, os procedimentos e cuidados para os testes mais comumente utilizados no Brasil e a interpretação de seus resultados.

Desejamos que este curso seja um incentivo para repensar e aperfeiçoar a sua prática. Releia os conteúdos deste manual e assista ao vídeo sempre que precisar.

**Bons estudos!**

O sistema TELELAB de ensino a distância foi criado em 1997, e produziu, ao longo do tempo, 23 cursos com títulos dedicados ao diagnóstico laboratorial das DST, Aids, hepatites virais e das atividades hemoterápicas.

A evolução tecnológica e as novas políticas para ampliação do acesso dos usuários aos serviços de saúde tornaram necessária a atualização de seus conteúdos.

Este novo curso **Sífilis – Estratégias para Diagnóstico no Brasil** da série TELELAB atualiza os conteúdos do manual **“Diagnóstico laboratorial da sífilis”** da primeira série e reconhece o trabalho dos pioneiros que criaram e trabalharam na produção dos cursos que agora estão sendo revisados e reformulados.

Autores do manual **“Diagnóstico laboratorial da sífilis”** da primeira série:

- Claudia Renata Fernandes Martins (*in memorian*)
- José Antonio Pinto Sá Ferreira
- Luiz Alberto Peregrino Ferreira
- Luiz Fernando de Góes Siqueira (*in memorian*)
- Maria Luiza Bazzo
- Miriam Franchini
- Oscar Jorge Berro
- Silvio Valle

**Consultoria pedagógica** da primeira série: Maria Lúcia Ribinick e Maristela Arantes Marteleto.



## Considerações gerais

Agora você faz parte do Sistema de Educação a Distância – TELELAB – para profissionais da saúde envolvidos no diagnóstico laboratorial das doenças sexualmente transmissíveis, da infecção pelo HIV/Aids e das hepatites virais.

O projeto TELELAB foi criado para levar até você informações indispensáveis para que o seu trabalho seja realizado nos padrões de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

Guarde este Manual para consultar sempre que necessário.

Ele é seu, use-o!

### Funcionamento do seu curso TELELAB:

---

#### Inscrição e pré-teste:

---

- Agora que você já fez a inscrição e o pré-teste, pode começar o seu curso! Você tem um mês para concluí-lo.

---

#### Vídeo e manual:

---

- Assista ao vídeo quantas vezes você precisar. No Manual estão todos os conteúdos para o seu estudo. Aproveite!

---

#### Pós-teste e avaliação do curso:

---

- Faça o **pós-teste** para avaliar o quanto você aprendeu. Depois, responda ao questionário de **avaliação do curso**. Suas opiniões nesse questionário são fundamentais para a melhoria do TELELAB.

---

#### Certificado:

---

- Para obter o certificado, você deverá acertar no mínimo 80% do pós-teste.

Ao final do curso **Sífilis – Estratégias para Diagnóstico no Brasil**, você será capaz de:

- Conhecer a história da sífilis na sociedade ocidental e o desenvolvimento dos testes laboratoriais.
- Identificar o agente etiológico da sífilis – *Treponema pallidum* – e a história natural da doença.
- Realizar os testes treponêmicos (FTA-abs, MHA-TP/TPHA/TPPA e ELISA) e os não treponêmicos quantitativos e qualitativos (VDRL com amostra de soro e de líquido) disponíveis no país, os testes quantitativos e qualitativos, os testes rápidos e as etapas do diagnóstico da sífilis – a triagem e a etapa confirmatória.

Para esclarecimento de dúvidas e sempre que precisar, comunique-se diretamente com:

**TELELAB**

**Por telefone:** 0800-61-2436

**Por e-mail:** [telelab@aids.gov.br](mailto:telelab@aids.gov.br)

# Sumário

<b>Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>Capítulo 1: História da sífilis e dos testes para o diagnóstico laboratorial .....</b>	<b>11</b>
Primeiros escritos sobre a sífilis.....	13
Quando surgiram os testes laboratoriais da sífilis.....	14
<b>Capítulo 2: A história natural da sífilis: fases evolutivas e o surgimento de anticorpos .....</b>	<b>17</b>
Descoberta do agente etiológico da sífilis.....	19
<i>Treponema pallidum</i> .....	19
A história natural da doença .....	20
O diagnóstico laboratorial da sífilis .....	24
<b>Capítulo 3: Testes para o diagnóstico laboratorial da sífilis .....</b>	<b>25</b>
Testes treponêmicos .....	27
Testes não treponêmicos .....	27
O fenômeno de prozona.....	28
Diferenças entre os testes não treponêmicos e os treponêmicos.....	28
Técnicas utilizadas nos testes para o diagnóstico da sífilis.....	29
Os exames laboratoriais para o diagnóstico da sífilis primária .....	30
<b>Capítulo 4: Teste não treponêmico de flocação e seus procedimentos...31</b>	<b>31</b>
Os testes de flocação.....	33
Testes de flocação e sua composição antigênica.....	35
Principais características dos testes de flocação .....	35
Escolha do teste de flocação para diagnóstico da sífilis.....	36
<b>Capítulo 5: A reação de VDRL com amostra de soro.....</b>	<b>37</b>
Ação 1 – Organização dos materiais necessários para o teste de VDRL.....	40
Ação 2 – Preparar os protocolos de trabalho .....	41
Ação 3 – Preparar a suspensão antigênica de VDRL .....	42
Ação 4 – Calibrar a agulha .....	43
Ação 5 – Utilizar soros controle .....	45

Ação 6 – Validar a suspensão antigênica.....	45
Ação 7 – Realizar reação de VDRL qualitativa.....	48
Ação 8 – Realizar reação de VDRL quantitativa .....	50
Ação 9 – Registrar e liberar os resultados do teste de VDRL .....	52
<b>Capítulo 6: A reação de VDRL em amostras de líquido .....</b>	<b>53</b>
Cuidados com a amostra de líquido para fazer o VDRL.....	55
Passo a passo do VDRL em amostras de líquido.....	56
Reação de VDRL quantitativa no líquido .....	59
<b>Capítulo 7: Controle de qualidade dos testes de floculação .....</b>	<b>61</b>
Soros-controle.....	63
Cuidados com os soros-controle .....	65
Recomendações para o teste RPR .....	67
<b>Capítulo 8: Testes treponêmicos .....</b>	<b>69</b>
Características gerais dos testes treponêmicos .....	71
Testes treponêmicos mais utilizados no Brasil.....	72
TESTE FTA-abs ( <i>Fluorescent treponemal antibody absorption</i> ) .....	73
Testes MHA-TP (Micro-hemaglutinação para <i>Treponema pallidum</i> ) e da aglutinação indireta.....	76
Teste treponêmico imunoenzimático ELISA ou de quimioluminescência .....	80
<b>Capítulo 9: Testes rápidos para sífilis.....</b>	<b>83</b>
Princípios metodológicos dos TR para diagnóstico da sífilis.....	84
Leitura do teste rápido para sífilis .....	85
A escolha do teste rápido .....	87
<b>Capítulo 10: Interpretação dos resultados dos testes de sífilis .....</b>	<b>89</b>
Como deve ser a interpretação dos resultados.....	91
Cicatriz sorológica e baixos títulos .....	92
Como avaliar a resposta ao tratamento da sífilis.....	92
Negativação dos testes não treponêmicos .....	92
Limitações dos testes treponêmicos .....	93
Outros cuidados necessários.....	94
<b>Glossário.....</b>	<b>95</b>
<b>Referências.....</b>	<b>97</b>





## Introdução

A sífilis é uma enfermidade sistêmica, exclusiva do ser humano, conhecida desde o século XV, e seu estudo ocupa todas as especialidades médicas.

Tem como principal via de transmissão o contato sexual, seguido pela transmissão vertical para o feto durante o período de gestação de uma mãe com sífilis não tratada ou tratada inadequadamente. Também pode ser transmitida por transfusão sanguínea.

A apresentação dos sinais e sintomas da doença é muito variável e complexa. Quando não tratada, evolui para formas mais graves, podendo comprometer o sistema nervoso, o aparelho cardiovascular, o aparelho respiratório e o aparelho gastrointestinal.

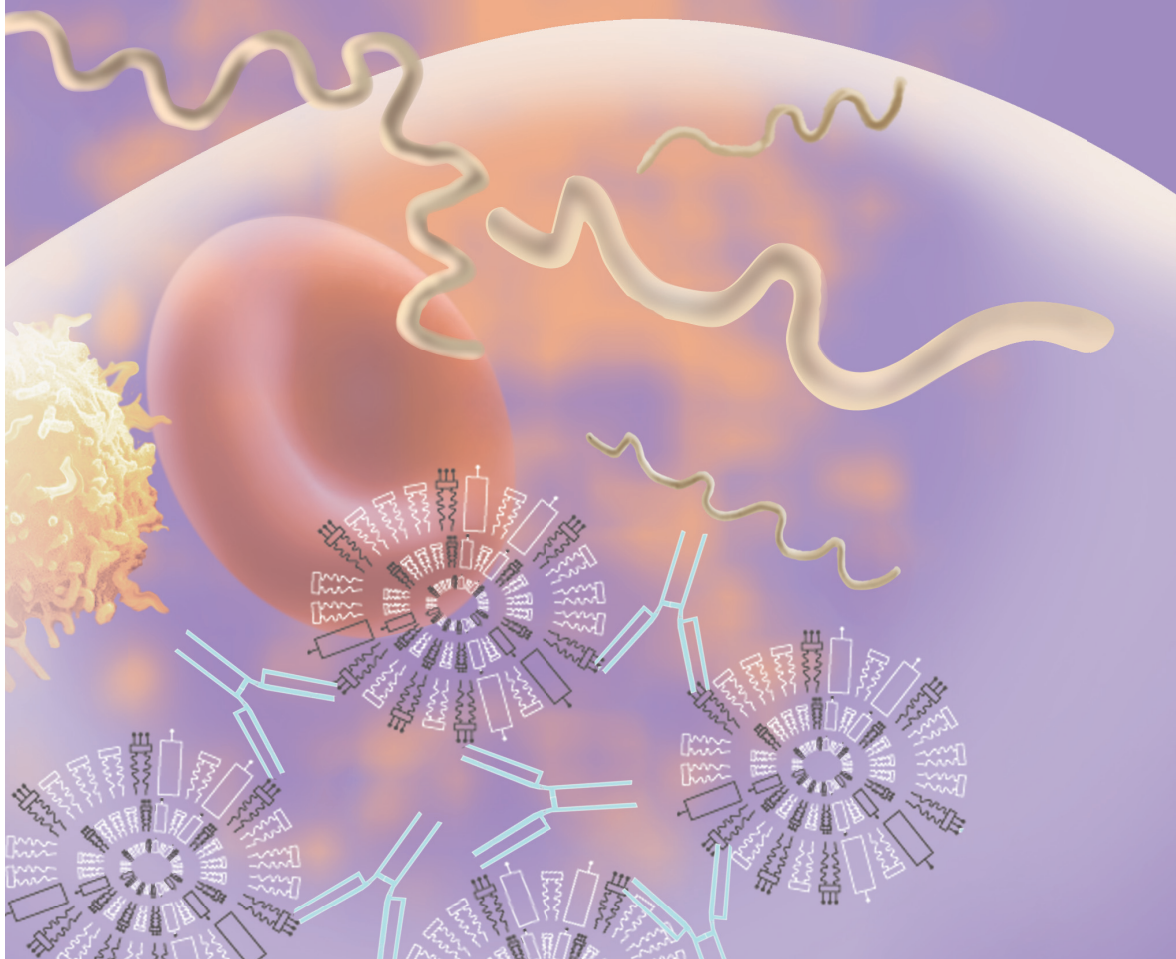
Embora o tratamento com penicilina seja muito eficaz nas fases iniciais da doença, métodos de prevenção devem ser implementados, pois adquirir sífilis expõe as pessoas a um risco aumentado para outras DST, inclusive a Aids.

O número de casos de sífilis vem aumentando no Brasil e, por isso, todos os profissionais da área da saúde devem estar atentos às suas manifestações.

Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial desempenha papel fundamental no combate à sífilis, por permitir a confirmação do diagnóstico e o monitoramento da resposta ao tratamento.

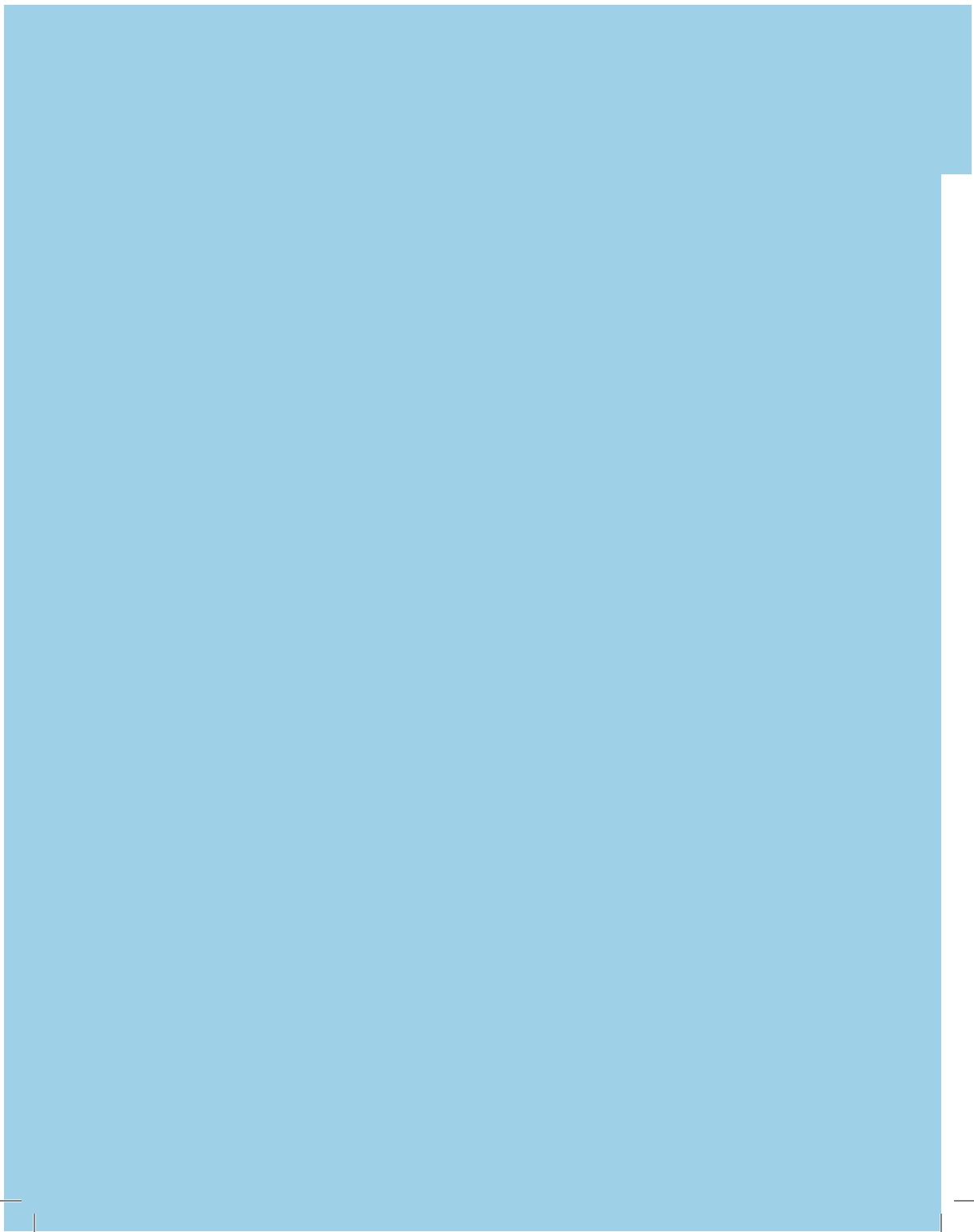
Finalmente, lembre-se que o resultado de todo exame laboratorial deve ter **qualidade** e que isso só será possível se houver padronização dos processos, controle da qualidade, desde a aquisição dos insumos e reagentes até a emissão do resultado, treinamento e comprometimento dos profissionais envolvidos.





## Capítulo 1

# História da sífilis e dos testes para o diagnóstico laboratorial





# História da sífilis e dos testes para o diagnóstico laboratorial

Neste capítulo você vai conhecer um pouco sobre a história da sífilis na sociedade ocidental e o desenvolvimento dos testes laboratoriais.

## Primeiros escritos sobre a sífilis

O termo **sífilis** originou-se de um poema, com 1.300 versos, escrito em 1530 pelo médico e poeta Girolamo Fracastoro em seu livro intitulado ***Syphilis Sive Morbus Gallicus*** (“*A sífilis ou mal gálico*”). Ele narra a história de Syphilus, um pastor que amaldiçoou o deus Apolo e foi punido com o que seria a doença sífilis.

Em 1546, o próprio Fracastoro levantou a hipótese de que a doença fosse transmitida na relação sexual por pequenas sementes que chamou de “*seminaria contagionum*”. Nessa época, essa ideia não foi levada em consideração e, apenas no final do século XIX, com Louis Pasteur, passou a ter crédito.

### Uma breve história da sífilis

*“Todos nós herdamos no sangue lusitano uma boa dosagem de lirismo. Além da sífilis, é claro.”*

Calabar, Chico Buarque e Ruy Guerra

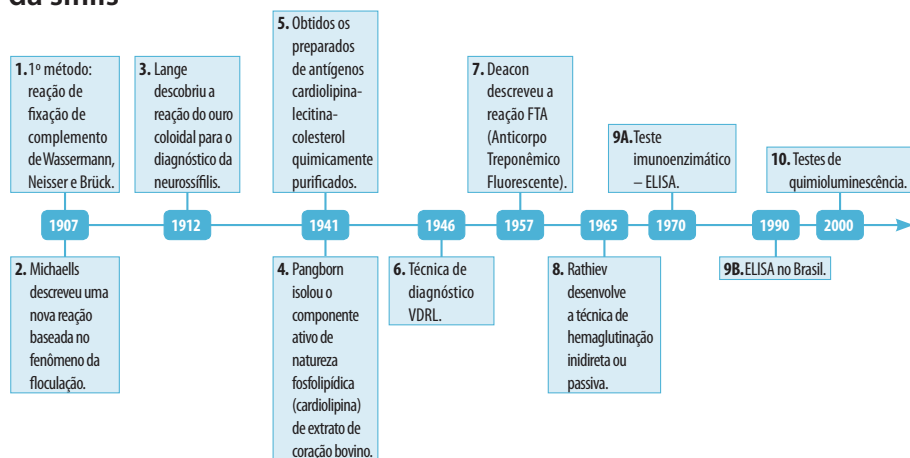
Atualmente, há certo consenso quanto ao fato da sífilis ter sido uma doença desconhecida no Velho Mundo até o final do século XV, porém sua origem geográfica continua causando polêmicas.

Sabe-se que no ano de 1495, quando a cidade de Nápoles foi cercada por tropas francesas comandadas pelo Rei Carlos VIII, as tropas espanholas foram enviadas à cidade para reforçar a sua defesa. Após a tomada da cidade pelos franceses, surgiu em suas tropas uma doença, causadora de muitas mortes e que, por intermédio de mercenários, rapidamente espalhou-se pela Europa.

Foi originalmente denominada **“Mal de Nápoles”**, mas na Itália e na Alemanha ficou conhecida como **“Mal francês”**; na França chamaram-na de **“Mal italiano”**, na Polónia a denominaram de **“Mal alemão”** e na Rússia de **“Mal polonês”**.

## Quando surgiram os testes laboratoriais da sífilis

### Linha do tempo – desenvolvimento do diagnóstico laboratorial da sífilis



1. O primeiro método para o diagnóstico laboratorial foi a reação de fixação de complemento de Wassermann, Neisser e Brück, descrita em 1907, com a qual foi detectada a taxa de 80% de positividade em 94 amostras estudadas.

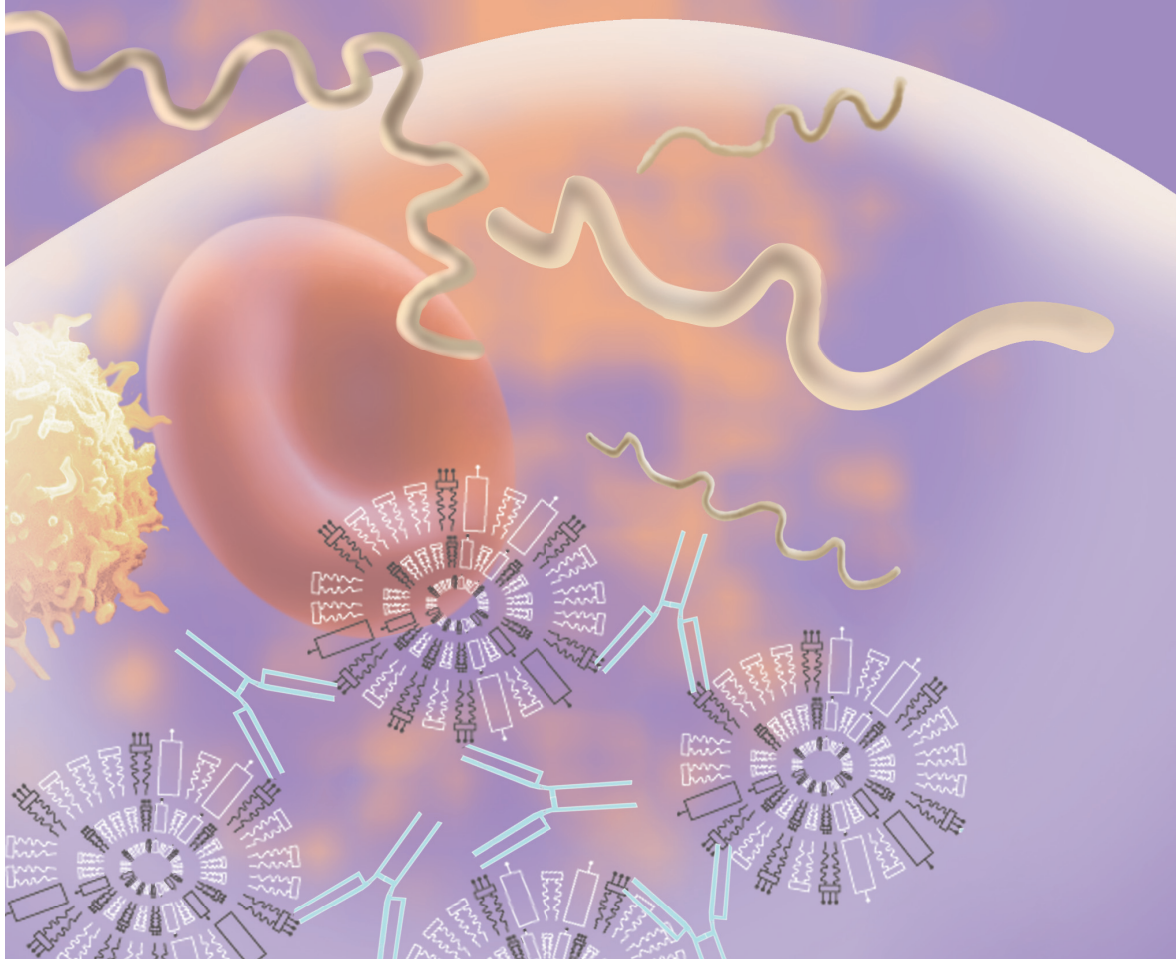
2. Ainda em 1907, Michaelis descreveu uma nova reação baseada no fenômeno da floculação utilizando os mesmos antígenos empregados na fixação do complemento. Uma série de reações surgiu com essa descoberta: reações de Kahn, Kline e Meinicke.
3. Em 1912, Lange descobriu a reação do ouro coloidal para o diagnóstico da neurosífilis.
4. Em 1941, Pangborn isolou o componente ativo de natureza fosfolipídica (cardiolipina) de extrato de coração bovino. A cardiolipina, quando combinada com a lecitina e o colesterol, forma antígeno sorologicamente ativo para detecção de anticorpos não treponêmicos nas amostras de pacientes com sífilis.
5. Logo a seguir, foram obtidos os preparados de antígenos cardiolipina-lecitina-colesterol quimicamente purificados, que quando empregados nos testes de floculação garantiram a reprodutibilidade dos resultados obtidos.
6. Em 1946, com a padronização desses novos antígenos purificados, foi desenvolvida a técnica de diagnóstico VDRL (*Venereal Diseases Research Laboratory*) que é usada até hoje. O teste de imobilização do *Treponema pallidum* (TPI) foi desenvolvido como resultado da descoberta de que o soro de paciente com a doença inibia a mobilidade dos treponemas. O TPI foi o primeiro teste de detecção de anticorpos antitreponema.
7. Em 1957, Deacon descreveu a reação FTA (Anticorpo Treponêmico Fluorescente) baseada no princípio da imunofluorescência. A reação foi, posteriormente, modificada pelo teste FTA-200 (diluição do soro a 1/200) visando eliminar as reações falso-positivas. Mas só em 1964, se tornou uma reação mais específica, com o teste FTA-abs (Anticorpo Treponêmico Fluorescente-adsorvido) descrito por Hunter, Deacon e Meyer.
8. Já a técnica de hemaglutinação indireta ou passiva foi desenvolvida por Rathlev e seu trabalho foi divulgado na publicação da Organização Mundial da Saúde, em 1965. Mais tarde, a equipe de Tomizawa introduziu modificações na técnica para aumentar a especificidade da reação.

9. O teste imunoenzimático – ELISA – foi desenvolvido na década de 1970, e ELISA-Tp tornou-se disponível no mercado brasileiro nos anos de 1990.
10. No início da década de 2000 foram desenvolvidos os testes de quimioluminescência com antígenos recombinantes de *Treponema pallidum*.

Existem muitos estudos sobre a padronização de um conjunto diagnóstico para detecção molecular do *Treponema pallidum*, porém a comercialização ainda não está disponível e os testes moleculares têm sido utilizados somente para fins de pesquisa.

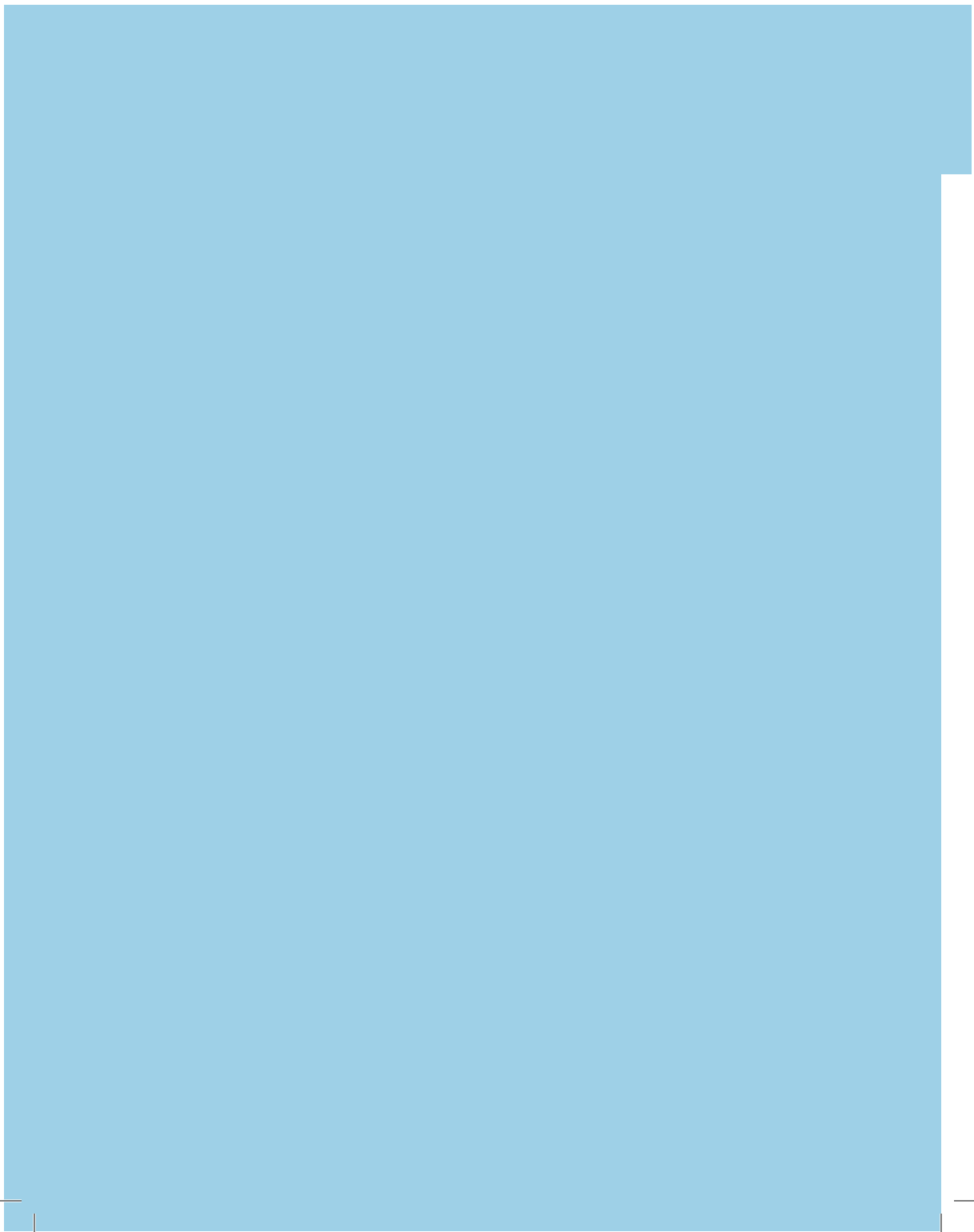
Recentemente, foram desenvolvidos os **testes rápidos**, a maioria deles baseados na técnica de imunocromatografia ou de fluxo lateral, que permitem detectar rapidamente os anticorpos treponêmicos e podem ser utilizados mesmo em locais sem infraestrutura laboratorial. Foram também desenvolvidos os conjuntos diagnósticos para amostras de sangue coletadas em papel-filtro. Esse tipo de amostra é de fácil coleta e pode ser transportada sem refrigeração.





## Capítulo 2

# A história natural da sífilis: fases evolutivas e o surgimento de anticorpos





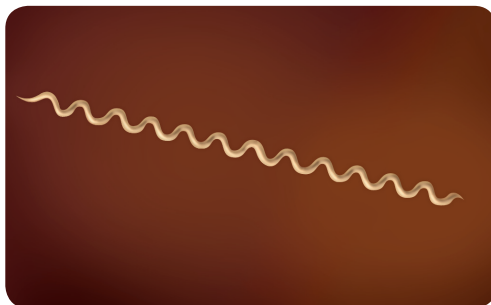
## A história natural da sífilis: fases evolutivas e o surgimento de anticorpos

Nesse capítulo você conhecerá o agente etiológico da sífilis – *Treponema pallidum* – a história natural da doença com suas diferentes fases evolutivas e o aparecimento dos anticorpos em cada uma delas.

### Descoberta do agente etiológico da sífilis

*Treponema pallidum*, o agente etiológico da sífilis, foi descoberto somente em **1905**, pelo zoologista Fritz Schaudin e pelo dermatologista Paul Erich Hoffman. Schaudin examinou o preparado a fresco, da amostra coletada por Hoffmann de pápula existente na vulva de uma mulher com sífilis secundária. Os dois observaram ao microscópio os microrganismos espiralados, finos, que giravam em torno do seu maior comprimento e que moviam-se para frente e para trás. Denominaram-os, inicialmente, de *Spirochaeta pallida* e, um ano depois, mudaram o nome para *Treponema pallidum*.

### *Treponema Pallidum*



**Figura 1** – *Treponema pallidum*

Morfologicamente o *Treponema pallidum* é uma espiral fina com espiras regulares e pontas afiladas. Possui cerca de 10 a 15 espiras e tem cerca de 8 micrômetros de comprimento, podendo apresentar variações no comprimento e no número de espiras.

O pouco conhecimento sobre a biologia do *T. pallidum* se deve à impossibilidade do seu cultivo em meios artificiais. O treponema tem baixa resistência ao meio ambiente, ressecando-se rapidamente. É também muito sensível à ação do sabão e de outros desinfetantes, podendo sobreviver por até 10 horas em objetos úmidos.

## A história natural da doença

A sífilis é uma doença de evolução lenta.

Quando não tratada, alterna períodos sintomáticos e assintomáticos, com características clínicas, imunológicas e histopatológicas distintas, divididas em três fases: **sífilis primária**, **sífilis secundária** e **sífilis terciária**.

Não havendo tratamento após a sífilis secundária, existem dois **períodos de latência**: um recente, com menos de um ano, e outro de latência tardia, com mais de um ano de doença.

A infecção pelo *Treponema pallidum* não confere imunidade permanente, por isso, é necessário diferenciar entre a persistência de exames reagentes (cicatriz sorológica) e a reinfeção pelo *T. pallidum*.

### Sífilis primária

#### Descrição:

Após a infecção, ocorre um período de incubação entre 10 e 90 dias. O primeiro sintoma é o aparecimento de uma lesão única no local de entrada da bactéria. A lesão denominada cancro duro ou protossifiloma é indolor, tem a base endurecida, contém secreção serosa e muitos treponemas. A lesão primária se cura espontaneamente, num período aproximado de duas semanas.

As lesões sifilíticas facilitam a entrada do vírus da imunodeficiência humana – HIV. As análises de pacientes com infecção simultânea por HIV e *T. pallidum* indicam alterações tanto na **resposta imune humoral**<sup>6</sup>

do paciente quanto na resposta à terapia para sífilis. Além disso, a sífilis acelera a evolução para Aids e a infecção pelo HIV altera a história natural de sífilis.

### ***Diagnóstico laboratorial:***

Na sífilis primária, o diagnóstico laboratorial pode ser feito pela pesquisa direta do *Treponema pallidum* por microscopia de campo escuro, pela coloração de Fontana-Tribondeau, que utiliza sais de prata, e pela imunofluorescência direta. Os anticorpos começam a surgir na corrente sanguínea cerca de 7 a 10 dias após o surgimento do cancro duro, por isso nessa fase os testes sorológicos são não-reagentes.

O primeiro teste a se tornar reagente em torno de 10 dias da evolução do cancro duro é o FTA-abs, seguido dos outros testes treponêmicos e não treponêmicos.

Quanto mais precocemente a sífilis primária for tratada maior será a possibilidade dos exames sorológicos tornarem não-reagentes. Porém, mesmo após a cura, os testes treponêmicos podem permanecer reagentes por toda a vida.

## **Sífilis secundária**

### ***Descrição:***

Quando a sífilis não é tratada na fase primária, evolui para sífilis secundária, período em que o treponema já invadiu todos os órgãos e líquidos do corpo. Nesta fase, aparece como manifestação clínica o exantema (erupção) cutâneo, rico em treponemas e se apresenta na forma de máculas, pápulas ou de grandes placas eritematosas branco-acinzentadas denominadas *condiloma lata*, que podem aparecer em regiões úmidas do corpo.

### ***Diagnóstico laboratorial:***

Na sífilis secundária, todos os testes sorológicos são reagentes e os testes quantitativos tendem a apresentar títulos altos. Após o tratamento nessa fase, os testes treponêmicos permanecem reagentes por toda

a vida do usuário, enquanto os testes não treponêmicos podem ter comportamento variável. Em alguns indivíduos ficam não reagentes e em outros permanecem indefinidamente reagentes em baixos títulos.

## Sífilis latente

### ***Descrição:***

Se não houver tratamento, após o desaparecimento dos sinais e sintomas da sífilis secundária, a infecção entra no período latente, considerado **recente** no primeiro ano e **tardio** após esse período. A sífilis latente não apresenta qualquer manifestação clínica.

### ***Diagnóstico Laboratorial:***

Nessa fase todos os testes sorológicos permanecem reagentes e observa-se uma diminuição dos títulos nos testes quantitativos.

Para diferenciar esta fase da infecção primária deve-se pesquisar no líquido a presença de anticorpos, utilizando-se o VDRL. Evidencia-se sífilis latente quando o VDRL é reagente no líquido, acompanhado de baixos títulos no soro.

## Sífilis terciária

### ***Descrição:***

A sífilis terciária pode levar dez, vinte ou mais anos para se manifestar.

A sífilis terciária se manifesta na forma de inflamação e destruição de tecidos e ossos. É caracterizada por formação de gomas sífilíticas, tumorações amolecidas vistas na pele e nas membranas mucosas, que também podem acometer qualquer parte do corpo, inclusive no esqueleto ósseo. As manifestações mais graves incluem a sífilis cardiovascular e a neurosífilis.

### ***Diagnóstico Laboratorial:***

Nesta fase os testes sorológicos habitualmente são reagentes e os títulos dos testes não treponêmicos tendem a ser baixos, porém podem

ocorrer resultados não reagentes. Em usuários que apresentam sintomas neurais, o exame do líquido – LCR é indicado, porém nenhum teste isoladamente é seguro para o diagnóstico da neurosífilis. Recomenda-se que o diagnóstico seja feito pela combinação da positividade do teste sorológico, aumento da células e de proteínas no LCR .

Para testagem do LCR, o VDRL é o exame recomendado, porém tem baixa sensibilidade (30 – 47% de resultados falso-negativos) e alta especificidade.

A infecção pelo *Treponema pallidum* não confere imunidade permanente, por isso, é necessário diferenciar entre a persistência de exames reagentes (cicatriz sorológica) e a reinfecção pelo *T. pallidum*.

### A sífilis congênita

Trata-se da infecção do feto em decorrência da passagem do treponema pela placenta.

É mais grave quanto mais recente for a infecção materna. Segundo estudo realizado em 2004, estima-se que a taxa de prevalência de mulheres portadoras de sífilis no momento do parto seja de 1,6%, o que corresponde a aproximadamente 49 mil parturientes infectadas e 12 mil nascidos vivos com sífilis, considerando-se uma taxa de transmissão de 25%, de acordo com estimativa da OMS ([www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)). Na gestação, a sífilis congênita se manifesta com abortamento, nascimentos prematuros ou nascimentos seguidos de morte. Ao nascer, a criança com sífilis congênita pode apresentar lesões bolhosas, ricas em treponemas, na palma das mãos, planta dos pés, ao redor da boca e do ânus.

Mesmo quando não se manifesta com essas características, a infecção congênita pode permanecer latente, vindo a se expressar durante a infância ou mesmo na vida adulta.

**A definição da sífilis congênita deve ser feita pelo médico levando em consideração a comparação dos resultados dos testes não treponêmicos da mãe e da criança, os resultados dos exames de imagem e dos sinais clínicos presentes na criança.**



### Atenção

Sempre que suspeitar de sífilis congênita deve-se fazer VDRL no líquido da criança.

## O diagnóstico laboratorial da sífilis

O diagnóstico laboratorial da sífilis depende da associação entre:

- a história do usuário;
- os dados clínicos; e
- a detecção de antígenos ou anticorpos por meio de testes laboratoriais.

Por isso, é importante conhecer a **evolução da doença**, as **diferentes fases da infecção** e o que cada **teste laboratorial** é capaz de detectar para utilizá-los adequadamente.



### Atenção

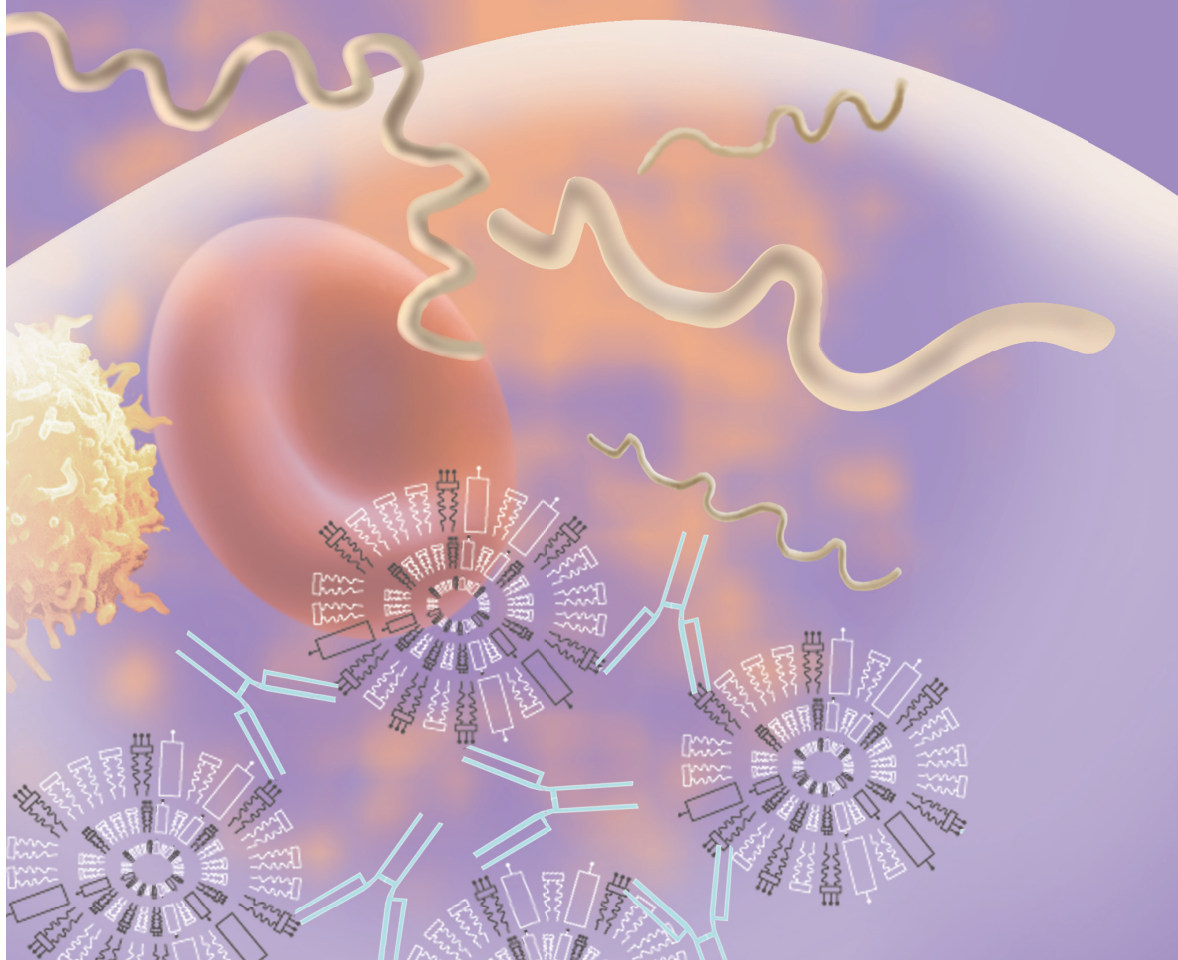
Quando não se pode estabelecer clinicamente a fase da sífilis deve-se fazer um teste treponêmico e um não treponêmico.

Note ainda que o diagnóstico laboratorial da sífilis por meio de exames sorológicos sempre é realizado em duas etapas:

- triagem e;
- confirmatória.

Neste manual você conhecerá os procedimentos indicados para a combinação dos testes das duas etapas.

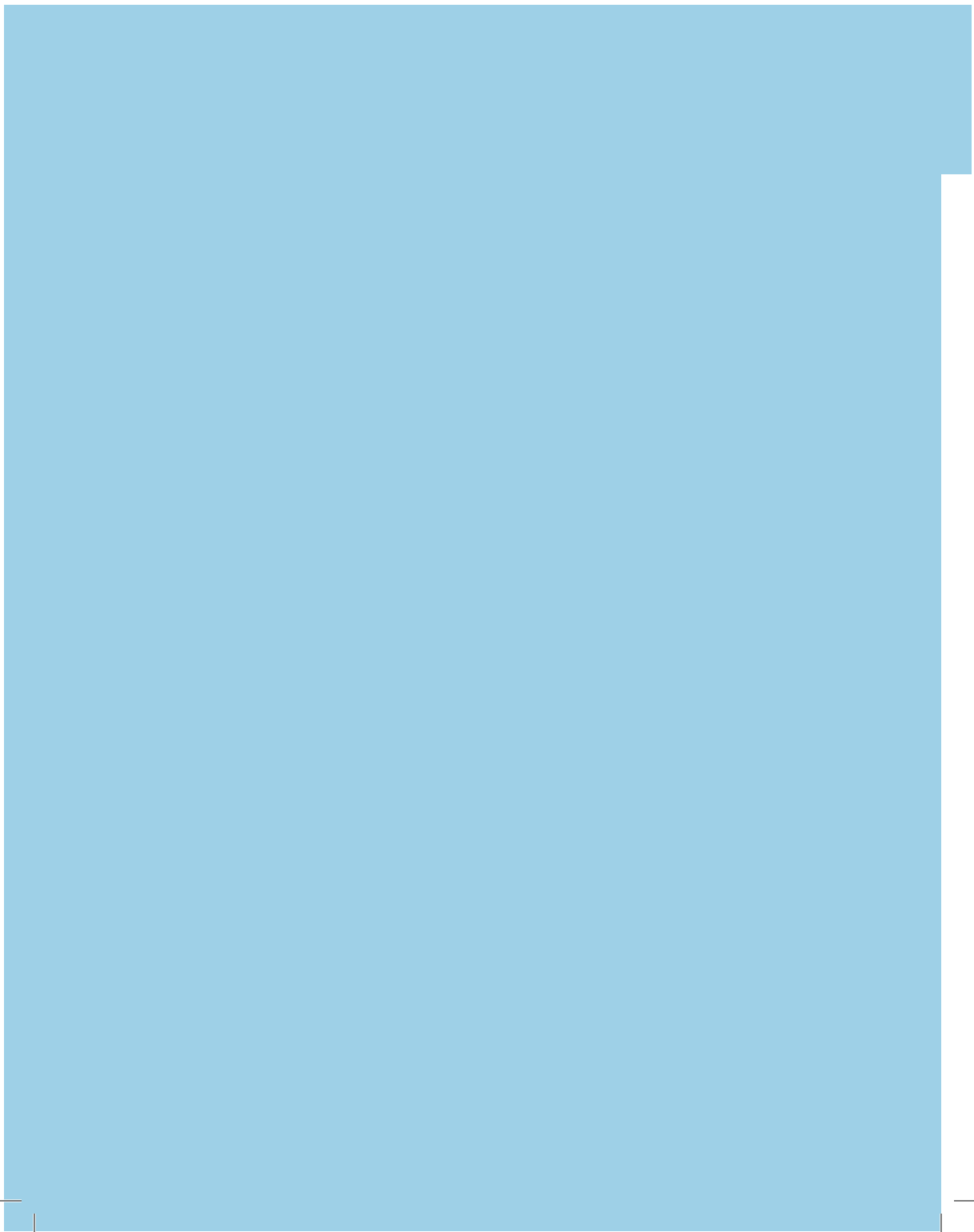




---

## Capítulo 3

# Testes para o diagnóstico laboratorial da sífilis





## Testes para o diagnóstico laboratorial da sífilis

Para o diagnóstico laboratorial da sífilis pode-se utilizar os **testes treponêmicos** e os **não treponêmicos**. Neste capítulo você conhecerá mais sobre cada um deles e sua importância no diagnóstico das diferentes fases de evolução da sífilis.

### Testes treponêmicos

São testes que empregam como antígeno *Treponema pallidum*, e detectam anticorpos antitreponêmicos. Esses testes são feitos apenas **qualitativamente**.

### Testes não treponêmicos

São testes que detectam **anticorpos não treponêmicos**, anteriormente chamados de **anticardiolipínicos, reagínicos ou lipóidicos**<sup>G</sup>.

Esses anticorpos não são específicos para *Treponema pallidum*, porém estão presentes na sífilis.

**Os testes não treponêmicos podem ser:**

- **Qualitativos:** rotineiramente são utilizados como testes de triagem para determinar se uma amostra é reagente ou não.
- **Quantitativos:** são utilizados para determinar o título dos anticorpos presentes nas amostras que tiveram resultado reagente no teste qualitativo e também para o monitoramento da resposta ao tratamento.

### O título no teste não treponêmico

O **título** é indicado pela última diluição da amostra que ainda apresenta reatividade ou floculação visível.

## O fenômeno de prozona

É a ausência de reatividade em uma amostra que, embora contenha anticorpos não treponêmicos, quando testada sem diluir, ou mesmo em baixas diluições, apresenta resultado não reagente.

Esse fenômeno decorre da relação desproporcional entre quantidade dos antígenos e dos anticorpos presentes na reação não treponêmica, gerando resultados falso-negativos.

Ocorre nas amostras de doentes com sífilis, em virtude da elevada quantidade de anticorpos presentes. Esse fenômeno não é observado nos testes treponêmicos.

É observado principalmente na sífilis secundária, fase em que há produção de grande quantidade de anticorpos.

## Diferenças entre os testes não treponêmicos e os treponêmicos

A diferença principal é que os testes não treponêmicos detectam anticorpos que não são específicos contra *Treponema pallidum* e os testes treponêmicos detectam anticorpos específicos para antígenos de *T. pallidum*.

### Resultados falso-positivos nos testes

Podem ocorrer em diferentes situações e tendem a apresentar títulos baixos nos testes não treponêmicos.

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

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

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

- em algumas infecções;
- após vacinações;
- uso concomitante de medicamentos;
- após transfusões de hemoderivados;
- na gravidez e em idosos.

Os testes não treponêmicos apresentam mais resultados falso-positivos. Cerca de 1% da população apresenta reatividade nos testes treponêmicos sem ter a infecção.

No exame FTA-abs, as reações falso-positivas habitualmente apresentam os treponemas com um padrão atípico de fluorescência em forma de contas (como de rosário). Isso ocorre, por exemplo, na **borreliose de Lyme**. Nesse caso, o FTA-abs é reagente e o VDRL geralmente é não reagente.

## Técnicas utilizadas nos testes para o diagnóstico da sífilis

Nos testes não treponêmicos:

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

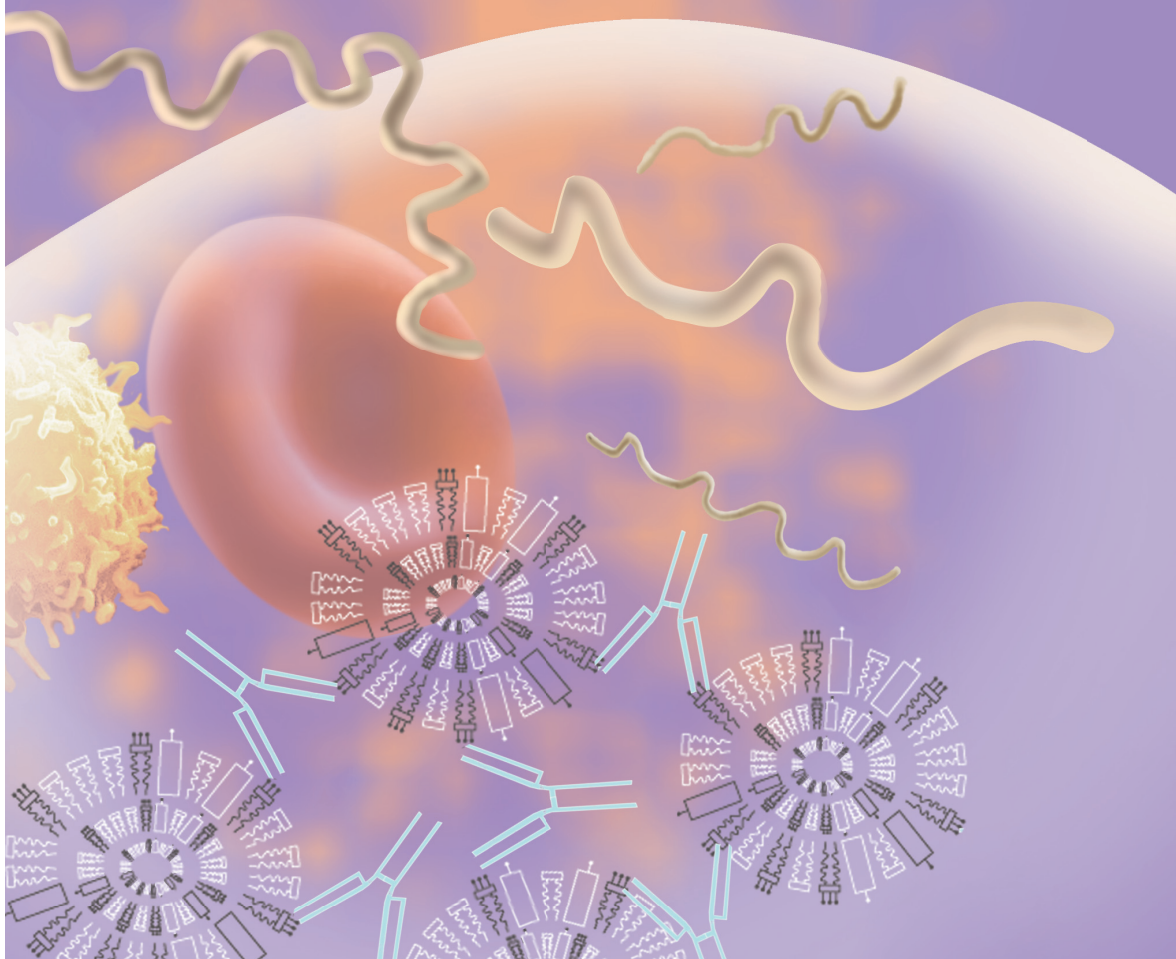
## Nos testes treponêmicos:

Técnica	Testes
Imunofluorescência indireta	FTA-abs ( <i>Fluorescent treponemal antibody absorption</i> )
Hemaglutinação	MHA-TP (microhemaglutinação para <i>Treponema pallidum</i> )
Aglutinação de partículas	TPPA ( <i>Treponema pallidum particle agglutination assay</i> )
Imunoenzimáticos e suas variações	ELISA ( <i>Enzyme-linked immunossorbent assay</i> ), CMIA (Ensaio imunológico quimioluminescente magnético)
Imunocromatografia e fluxo lateral	Testes rápidos
Testes moleculares	PCR

## Os exames laboratoriais para o diagnóstico da sífilis primária

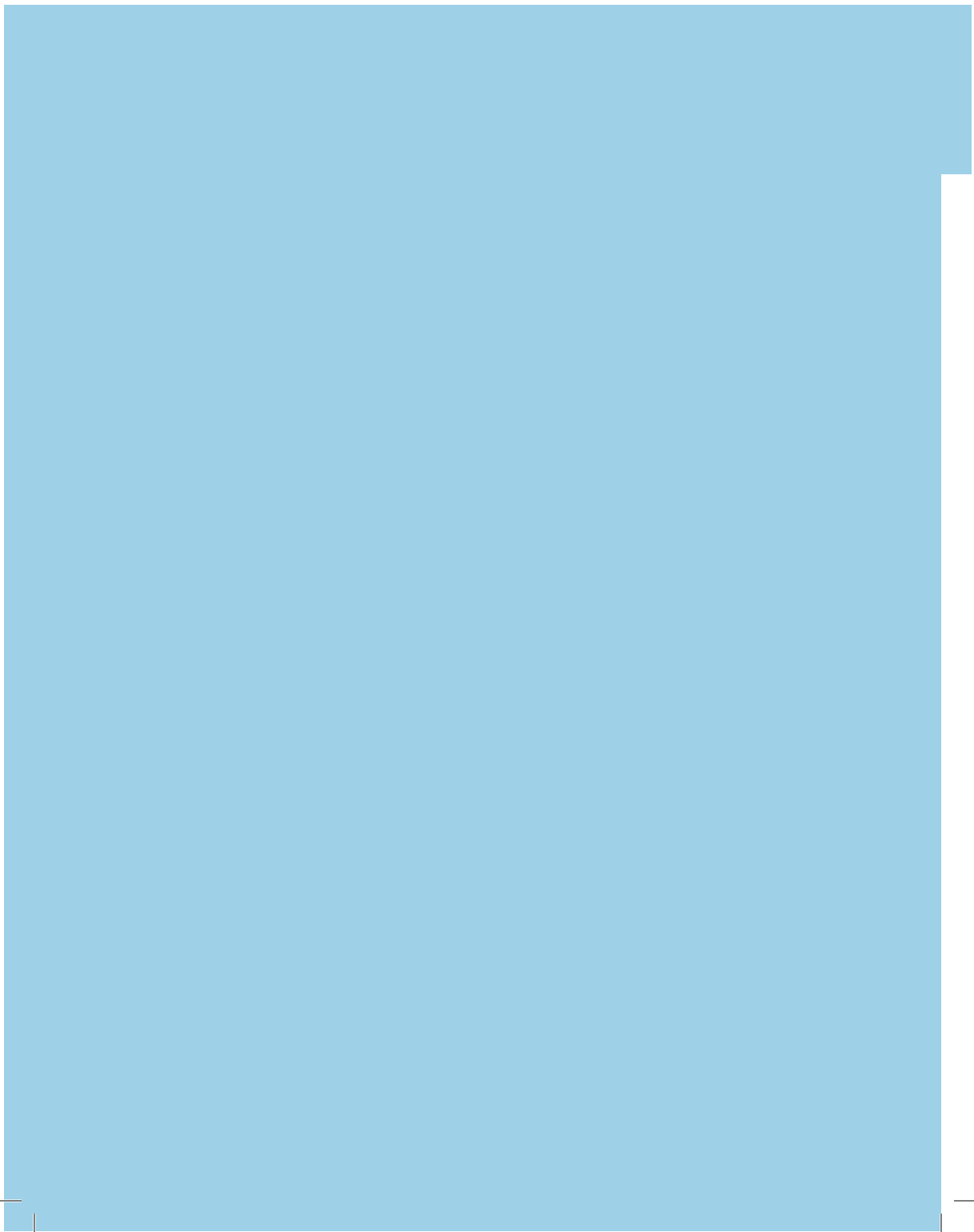
São de dois tipos:

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



## Capítulo 4

# Teste não treponêmico de floculação e seus procedimentos







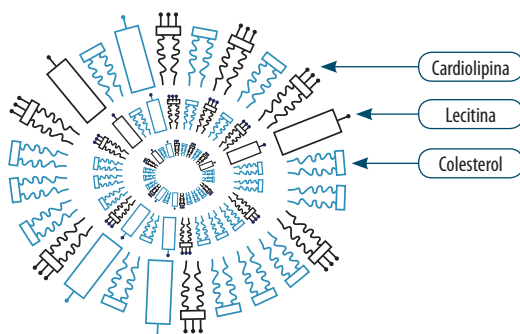
# Teste não treponêmico de floculação e seus procedimentos

Neste capítulo você vai conhecer detalhes das metodologias dos testes não treponêmicos disponíveis no país, seu funcionamento, suas indicações de uso e os cuidados que se deve ter para obter resultados precisos e confiáveis.

## Os testes de floculação

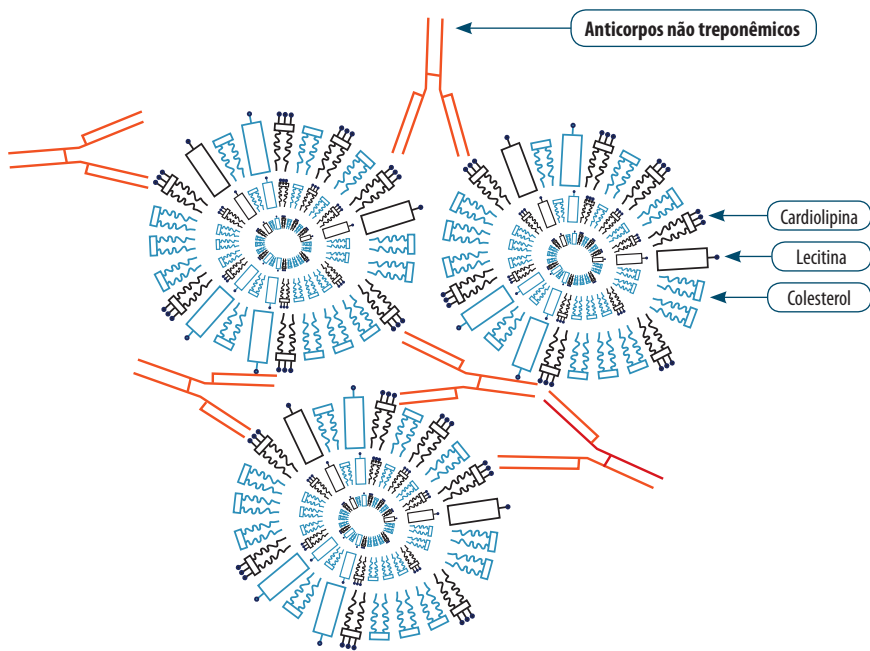
### Princípio metodológico dos testes de floculação

Os testes de floculação baseiam-se em uma suspensão antigênica que contém cardiolipina, colesterol e lecitina. No preparo da suspensão antigênica, a ligação desses componentes ocorre ao acaso e resulta na formação de estruturas arredondadas denominadas de micelas. Veja na figura abaixo.



**Figura 2** – Representação esquemática do antígeno dos testes não treponêmicos, na forma de micelas.

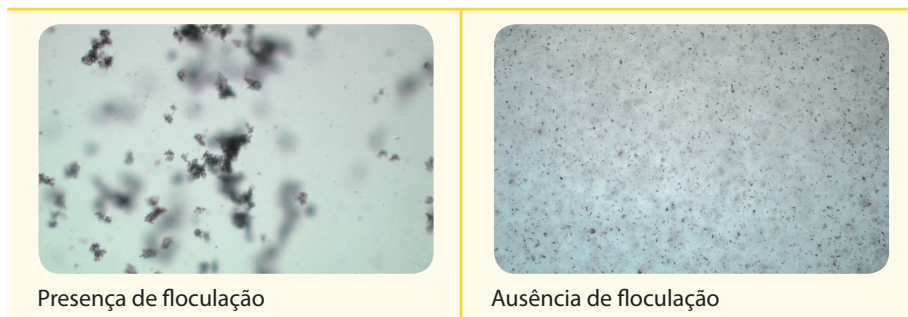
Os anticorpos não treponêmicos presentes na amostra ligam-se às cardiolipinas das micelas. A ligação de anticorpos em várias micelas resulta na **floculação**, que pode ser observada ao microscópio. Veja a seguir a figura que representa a ligação de várias micelas, por meio dos anticorpos.



**Figura 3** – Representação esquemática de uma reação de floculação na qual os anticorpos não treponêmicos se ligam simultaneamente em várias micelas.

## Observação da floculação

Essa ligação é vista na forma de flocos ou grumos, grandes ou pequenos, que podem ser visualizados a olho nu em alguns testes e em outros com auxílio de microscópio. Veja na Figura 4 algumas fotos da reação de VDRL feitas em microscópio óptico comum em aumento de 100 vezes.



**Figura 4** – Observação de floculação e da ausência de floculação na reação de VDRL.

## Testes de floculação e sua composição antigênica

Teste	Composição antigênica
VDRL ( <i>Venereal Disease Laboratory</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ cardiolipina (0,03%);</li> <li>■ colesterol (0,9%); e</li> <li>■ lecitina (0,21 +/- 0,1%).</li> </ul>
RPR ( <i>Rapid Plasma Reagin</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ cardiolipina;</li> <li>■ colesterol;</li> <li>■ lecitina;</li> <li>■ cloreto de colina para eliminar a necessidade de inativação da amostra;</li> <li>■ EDTA para aumentar a estabilidade da suspensão antigênica; e</li> <li>■ carvão para permitir a leitura da reação a olho nu.</li> </ul>
USR ( <i>Unheated Serum Reagin</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ cardiolipina;</li> <li>■ colesterol;</li> <li>■ lecitina;</li> <li>■ cloreto de colina; e</li> <li>■ EDTA.</li> </ul>
TRUST ( <i>Toluidine Red Unheated Serum Test</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ cardiolipina;</li> <li>■ colesterol;</li> <li>■ lecitina;</li> <li>■ cloreto de colina;</li> <li>■ EDTA;</li> <li>■ corante vermelho de toluidina para permitir a leitura da reação a olho nu.</li> </ul>

## Principais características dos testes de floculação



### Atenção

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

Veja no quadro abaixo as características e exigências de cada teste.

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

## Escolha do teste de floculação para diagnóstico da sífilis

A escolha do teste não treponêmico vai depender **das características do seu serviço**, tais como:

- O tipo de amostra a ser testada (líquor, soro ou plasma);
- Equipamentos disponíveis (banho-maria, microscópio); e
- Tamanho da rotina.

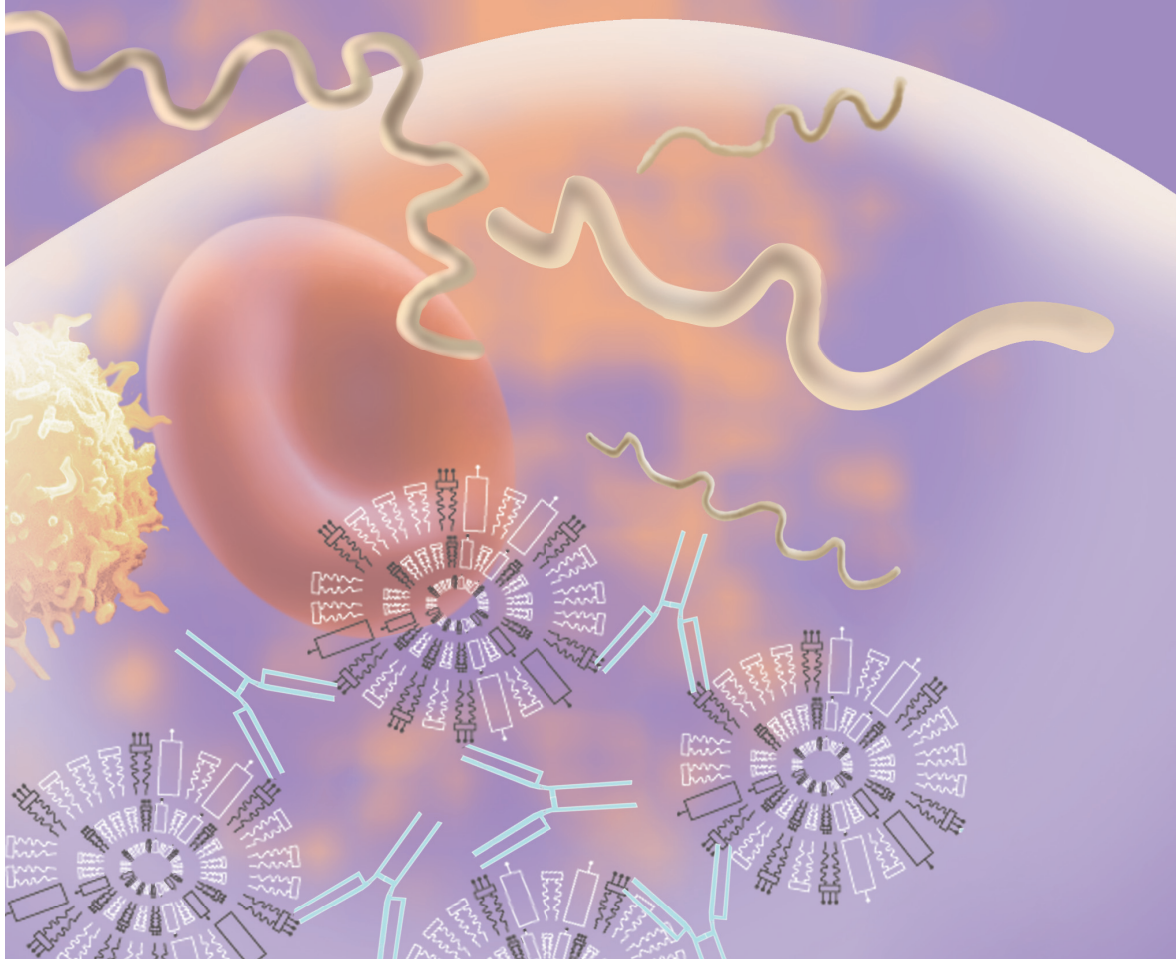
Outro fator a ser considerado na hora de escolher é a **qualidade do teste**. Antes de adquirir o conjunto diagnóstico para sífilis, certifique-se da qualidade do produto, solicitando ao fornecedor um **kit** para avaliar o desempenho.

Veja no capítulo 10 como fazer o controle de qualidade dos testes não treponêmicos.



### Atenção

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



## Capítulo 5

# A reação de VDRL com amostra de soro





## A reação de VDRL com amostra de soro

OVDR é um dos testes não treponêmicos muito utilizado no Brasil. Neste capítulo você conhecerá em detalhes a reação do VDRL feita com a suspensão antigênica preparada a partir do antígeno concentrado para o teste em amostras de soro.

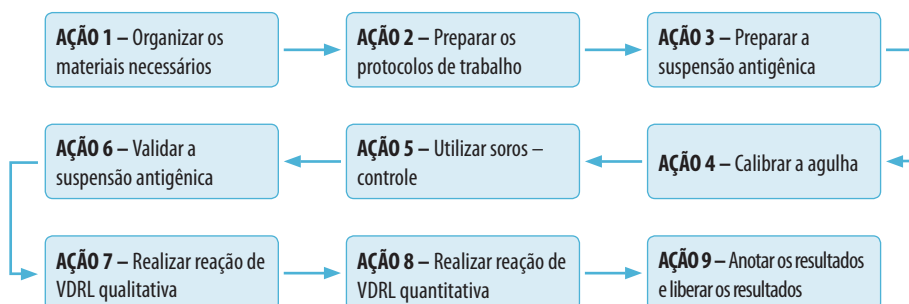


### Atenção

Antes de iniciar seu trabalho você deve consultar os protocolos de **Procedimentos Operacionais Padrão – POP**. Eles descrevem detalhadamente:

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

Veja a seguir a sequência de ações recomendadas para você fazer um teste VDRL.



Nos próximos tópicos, conheça o detalhamento das ações de 1 a 9:

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

**Os materiais necessários para realização do teste são:**

- Conjunto diagnóstico (*kit*) para VDRL;
- Solução salina (NaCl 0,9%);
- Soros controles: reagente com título conhecido e não reagente;
- Seringa de vidro de 1ml ou 2ml;
- Agulha calibrada para gotejar 17µl ou pipeta para volume de 17µl;
- Erlenmeyer de 25ml com tampa de vidro esmerilhado;
- Lâminas de vidro planas, demarcadas com 12 círculos com 14mm de diâmetro cada (lâminas de VDRL);
- Agitador orbital, tipo Kline, ajustado para  $180 \pm 2$  rpm;
- Microscópio óptico comum (objetiva 10X e ocular 10X);
- Banho-maria a 56°C;
- Tubos de ensaio 12 X 75mm, para as diluições em tubo;
- Pipetas de volume ajustável entre 50µl e 200µl;
- Ponteiras descartáveis para volumes entre 50µl e 200µl;
- Pipetas de vidro de 1ml e 5ml;
- Pêra ou macrocontrolador de pipetagem para pipetas de vidro;
- Recipiente para descarte de ponteiras;
- Recipiente de vidro para descontaminação de produtos biológicos, contendo solução aquosa de hipoclorito de sódio (uma parte de água sanitária comercial mais quatro partes de água);
- Recipiente com água e sabão neutro para colocar as pipetas de vidro utilizadas;
- Recipiente com álcool 70% (peso a peso – p/p) para colocar as lâminas de VDRL utilizadas;
- Cronômetro;
- Caneta para escrever em vidro;
- Protocolo de trabalho.





### Atenção

Verifique sempre o nível de água do banho-maria e se a temperatura está em 56°C.

## Ação 2 – Preparar os protocolos de trabalho

### Modelo de Protocolo de trabalho

[Cabeçalho com dados do serviço]

Kit:

Nome:

Lote:

Data de validade:

Fabricante:

Nome do responsável pelo teste:

Data de realização:

Modelo da lâmina e resultado encontrado

○ <sub>1</sub>	○ <sub>2</sub>	○ <sub>3</sub>	○ <sub>4</sub>
○ <sub>5</sub>	○ <sub>6</sub>	○ <sub>7</sub>	○ <sub>8</sub>
○ <sub>9</sub>	○ <sub>10</sub>	○ <sub>11</sub>	○ <sub>12</sub>

Posição de cada amostra ou da diluição na placa

1 \_\_\_\_ 2 \_\_\_\_ 3 \_\_\_\_ 4 \_\_\_\_

5 \_\_\_\_ 6 \_\_\_\_ 7 \_\_\_\_ 8 \_\_\_\_

9 \_\_\_\_ 10 \_\_\_\_ 11 \_\_\_\_ 12 \_\_\_\_

Resultado encontrado em cada círculo

R (reagente) ou NR (não reagente).

### Dicas importantes:

- Mantenha os POP atualizados, fazendo as alterações sempre que o fabricante fizer modificações na bula.
- Observe se houve alteração dos procedimentos recomendados pelo fabricante para testes de diferentes lotes.
- Observe se os procedimentos variam quando o conjunto diagnóstico é utilizado com amostras diferentes como, por exemplo, VDRL no soro ou no líquido.

- Leia sempre as bulas e mantenha-as disponíveis para consulta.
- Antes de iniciar seu trabalho diário, reveja o conteúdo dos POP e compare se está de acordo com as bulas.

## Ação 3 – Preparar a suspensão antigênica de VDRL

O preparo da suspensão antigênica a partir do antígeno concentrado deve seguir as instruções do fabricante, que habitualmente segue as recomendações internacionais.

No quadro a seguir você encontrará a descrição dos procedimentos, de acordo com a padronização internacional.

### Instruções para preparo da suspensão antigênica

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



### Atenção

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

#### Dicas importantes:

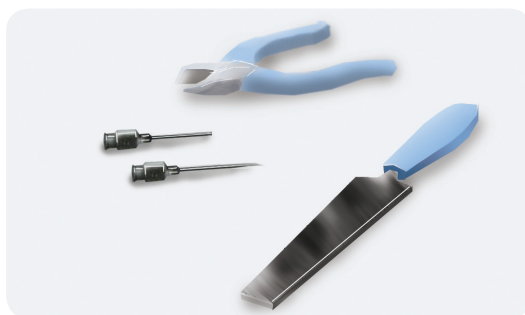
- Prepare sempre o volume de 5,0ml de suspensão antigênica, seguindo o procedimento descrito no quadro **“INSTRUÇÕES PARA PREPARO DA SUSPENSÃO ANTIGÊNICA”**, mesmo que a quantidade de amostras a ser analisada seja pequena.
- Se houver um grande número de amostras na sua rotina laboratorial, prepare duas, três ou mais suspensões antigênicas com o volume total de 5ml cada.
- Não prepare volumes superiores a 5 ml em um mesmo Erlenmeyer.
- Nunca altere os volumes da salina tamponada e do antígeno recomendados pelo fabricante;
- Jamais utilize tampas de borracha no Erlenmeyer porque ocorre a desestabilização das micelas;
- Evite pipetas de plástico para a preparação da suspensão antigênica porque o antígeno pode se aderir ao plástico;
- A qualidade da reação de VDRL depende do preparo da suspensão antigênica.

## Ação 4 – Calibrar a agulha

Veja, a seguir, como calibrar a agulha que será usada na seringa para adicionar a suspensão antigênica na reação de VDRL:

1. Corte o bisel de uma agulha de calibre 18G (*gauge*), de tal maneira que a estrutura metálica da agulha não fique amassada ou inadequada para uso;
2. Faça a calibração da agulha executando os passos descritos a seguir:
  - a) Coloque a agulha em uma seringa de vidro de 1ml ou 2ml;

- b) Aspire a suspensão antigênica até o volume acima da marca de 1ml na seringa;
- c) Retire o êmbolo e segure a seringa como se fosse uma pipeta;
- d) Posicione a seringa verticalmente sobre o Erlenmeyer vazio;
- e) Deixe as gotas da suspensão antigênica fluírem no Erlenmeyer até atingir a marca de 1ml;
- f) Comece a contar cada gota;
- g) Pare a contagem quando a suspensão atingir a marca de 0,5ml na seringa;
- h) O resultado esperado é de 30 ( $\pm 1$ ) gotas para cada 0,5ml da suspensão antigênica. Esse volume corresponde a cerca de 17 $\mu$ l por gota.



**Figura 5** – Agulha calibrada, agulha com bisel, lima e alicate utilizados para calibrar a agulha.

#### **Como proceder se a calibração não corresponder ao número de gotas esperado**

1. Se o número de gotas for maior que 31, a agulha é fina demais e o volume de antígeno menor que o indicado para cada gota. Neste caso você deve substituí-la.
2. Se o número de gotas for menor que 29, você pode tentar ajustar a agulha, pressionando levemente sua ponta com um alicate. Em seguida, repita o teste de calibração da agulha, até encontrar o volume indicado.

## Ação 5 – Utilizar soros controle

Os **soros controle** são amostras que foram previamente caracterizadas como não reagentes (soros controle negativo) ou reagentes (soros controle positivo). Seu uso na rotina diária permite ao profissional assegurar-se da qualidade do antígeno e dos testes que realiza.

Veja a seguir como utilizar soros controle para validar a suspensão antigênica. Aprenda mais sobre este tema no **capítulo 7 – Controle de qualidade dos testes de floculação**, deste manual.



### Atenção

Mantenha os soros controles congelados a -20°C.

## Ação 6 – Validar a suspensão antigênica

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



### Atenção

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

Veja a seguir o passo a passo dessa tarefa, utilizando soros controle positivo com título 16 ou diluição 1/16 com a execução das diluições diretamente na lâmina de VDRL:

1. Faça seu protocolo de trabalho marcando a posição do controle negativo e das diluições do controle positivo;

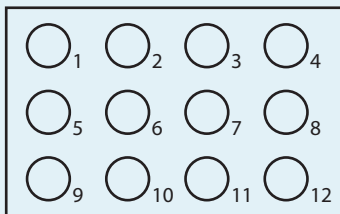
## Modelo de Protocolo de trabalho

[Cabeçalho com dados do serviço]

Kit:  
Nome:  
Lote:  
Data de validade:  
Fabricante:

Nome do responsável pelo teste:  
Data de realização:

Validação da suspensão  
antigênica



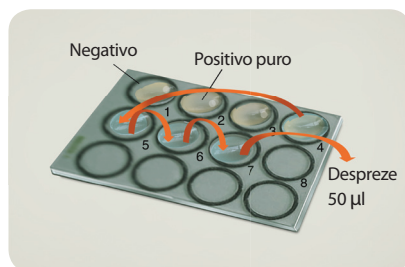
Posição dos soros controle na lâmina

1 Neg \_\_\_\_ 2 Pos puro 3 Pos 1/2 \_\_\_\_ 4 Pos 1/4  
5 Pos 1/8 6 Pos 1/16 7 Pos 1/32 8 \_\_\_\_  
9 \_\_\_\_ 10 \_\_\_\_ 11 \_\_\_\_ 12 \_\_\_\_

### Legenda:

Neg = controle negativo; Pos puro = controle positivo puro

2. Descongele os soros controle e, posteriormente, faça a inativação em banho-maria a 56°C por 30 minutos.
3. Utilize a suspensão antigênica preparada na **ação 3**;
4. Faça diluições seriadas do soro controle positivo: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, **diretamente na lâmina**, conforme apresentado a seguir. Para isso:
  - a) Pipete 50µl de solução salina nos círculos de números 3 a 7;
  - b) Em seguida pipete no 2º círculo 50 µl de soro controle positivo;
  - c) Pipete 50µl de soro controle positivo no 3º círculo, homogeneíze o soro com a solução salina e transfira 50µl dessa mistura para o 4º círculo;
  - d) Homogeneíze o conteúdo do 4º círculo e transfira 50µl dessa mistura para o 5º círculo;
  - e) Homogeneíze e transfira-o sucessivamente, até o 7º círculo;
  - f) Homogeneíze a mistura no 7º círculo, retire 50µl e despreze-a em recipiente próprio para descarte de produto biológico;



**Figura 6** – Diluição da amostra em lâmina.

5. Pipete no 1º círculo 50µl do soro controle negativo;
6. Homogeneíze a suspensão antigênica, cuidadosamente, por inversão;
7. Aspire a suspensão antigênica até encher a seringa, retire o êmbolo, deixe cair algumas gotas para eliminar bolhas de ar e dispense exatamente uma gota em cada um dos círculos de 1 a 7;
8. Coloque a lâmina no agitador orbital e deixe agitar por 4 minutos a 180 rpm;
9. Faça a leitura da reação em microscópio óptico com objetiva de 10X e ocular de 10X, imediatamente após o término da agitação;
10. A suspensão antigênica estará validada se o controle negativo não apresentar floculação e se o controle positivo apresentar o título esperado, neste caso de 1/16.



### Atenção

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

### Dicas importantes:

- Não misture a suspensão antigênica fazendo-a passar pela seringa e agulha, pois pode haver quebra das micelas e perda da reatividade;

- Soros controle inativados a mais de 4 horas devem ser reativados a 56°C por 10 minutos;
- Você deve validar cada suspensão antigênica já preparada antes de utilizá-la na sua rotina e todas as vezes que preparar nova suspensão;
- A suspensão antigênica do VDRL é estável por até 8 horas;
- Caso você faça RPR, USR ou THRUST valide também a suspensão antigênica pronta para uso antes de iniciar sua rotina.

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

## Ação 7 – Realizar reação de VDRL qualitativa

Antes de iniciar a reação, faça um **protocolo** para definir em que círculos da lâmina serão colocados os soros controle e as amostras em análise. Nesse caso, os soros controle são usados para estabelecer o parâmetro para a leitura da floculação e podem ser usados puros, uma vez que possuem reatividade conhecida.

### Modelo de Protocolo de trabalho

[Cabeçalho com dados do serviço]

Kit:  
Nome:  
Lote:  
Data de validade:  
Fabricante:

Nome do responsável pelo teste:  
Data de realização:

VDRL – qualitativo

○ <sub>1</sub>	○ <sub>2</sub>	○ <sub>3</sub>	○ <sub>4</sub>
○ <sub>5</sub>	○ <sub>6</sub>	○ <sub>7</sub>	○ <sub>8</sub>
○ <sub>9</sub>	○ <sub>10</sub>	○ <sub>11</sub>	○ <sub>12</sub>

Posição dos controles e das amostras na lâmina

1 Neg _____	2 Pos puro	3 Amostra usuário 1 pura	4 Amostra usuário 1 1/8
5 Amostra usuário 2 pura	6 Amostra usuário 2 1/8	7 Amostra usuário 3 pura	8 Amostra usuário 3 1/8
9 _____	10 _____	11 _____	12 _____

#### Legenda:

Neg = controle negativo; Pos puro = controle positivo puro.

Usuários 1, 2 e 3 = identificação da amostra de cada usuário.



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

1. Identifique um tubo para cada amostra;
2. Pipete **350µl** de **solução salina** em cada tubo previamente identificado;
3. Homogeneíze a **amostra** e pipete **50µl** no tubo correspondente. Com esses volumes você vai obter a diluição de 1/8.



**Figura 7** – Tubo indicando o volume de 350µl de solução salina e 50µl soro.

4. Pipete 50µl do soro controle negativo no 1º círculo da lâmina de VDRL;
5. Pipete 50µl do soro controle positivo no 2º círculo;
6. Pipete 50µl da amostra do usuário **1** pura (1/1) no 3º círculo;
7. Pipete 50µl da amostra do usuário **1** diluída a 1/8 no 4º círculo;
8. Repita o procedimento pipetando 50µl de cada amostra pura e diluída das amostras em análise, tendo o cuidado de seguir a ordem que você estabeleceu no protocolo de trabalho;
9. Homogeneíze delicadamente a suspensão antigênica;
10. Aspire a suspensão antigênica até encher a seringa, retire o êmbolo e deixe pingar, no próprio Erlenmeyer, algumas gotas para eliminar bolhas de ar;
11. Dispense exatamente uma gota em cada círculo da lâmina que contenha amostra;

12. Coloque a lâmina no agitador orbital e deixe-a por 4 minutos sob agitação de 180 rpm;
13. Faça a leitura da reação em microscópio óptico, imediatamente após o término da agitação. Utilize objetiva de 10X e ocular de 10X;
14. Compare o resultado do controle negativo com o resultado das amostras testadas, para determinar o padrão de ausência de reatividade:
  - a) Se a amostra estiver igual ao controle negativo, o resultado do VDRL será **não reagente**
  - b) Caso seja observada **reatividade** na amostra pura e/ou diluída a 1/8, deverá ser feito o **VDRL quantitativo** para determinar o título da amostra.



### Atenção

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

## Ação 8 – Realizar reação de VDRL quantitativa

Veja agora o exemplo de um VDRL quantitativo com diluições realizadas diretamente na lâmina.

Prepare antes seu **protocolo** de trabalho e defina os círculos nos quais serão pipetadas as amostras, as diluições que serão testadas e os soros controle.

1. Faça seu protocolo de trabalho marcando a posição dos controles e das diluições da amostra;
2. Faça diluições seriadas da amostra de 1/2 a 1/32. Você pode fazer a diluição em tubo e transferir 50 µl de cada diluição para a lâmina, conforme previsto no protocolo ou fazer a diluição **diretamente na lâmina**. Para isso:
  - a) Pipete 50µl de solução salina em cada um dos círculos de números 4 a 8;
  - b) Em seguida, pipete no 3º círculo 50µl da amostra 1;

- c) Pipete 50µl da amostra 1 no 4º círculo, homogeneíze o soro e a solução salina e transfira 50µl dessa mistura para o 5º círculo;
- d) Homogeneíze o conteúdo do 5º círculo e transfira 50µl dessa mistura para o 6º círculo;
- e) Homogeneíze e transfira, sucessivamente, até o 8º círculo;
- f) Homogeneíze a mistura no 8º círculo, retire 50µl e despreze em recipiente próprio para descarte de produto biológico;

### Modelo de Protocolo de trabalho

[Cabeçalho com dados do serviço]

Kit:

Nome:

Lote:

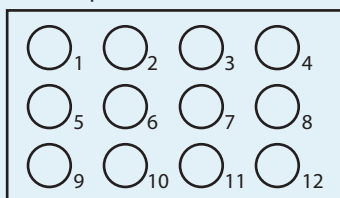
Data de validade:

Fabricante:

Nome do responsável pelo teste:

Data de realização:

VDRL – qualitativo



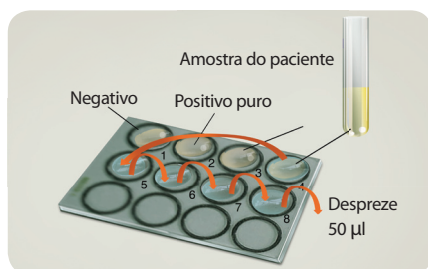
Posição dos soros controle e das diluições da amostra

1 Neg	2 Pos puro	3 Amostra usuário 1 pura	4 Amostra usuário 1 1/2
5 Amostra usuário 1 1/4	6 Amostra usuário 1 1/8	7 Amostra usuário 1 1/16	8 Amostra usuário 1 1/32
9 _____	10 _____	11 _____	12 _____

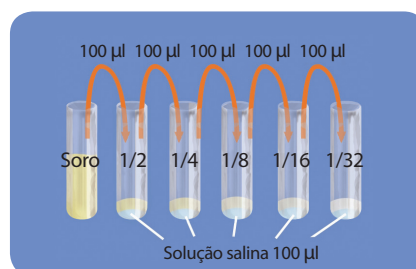
#### Legenda:

Neg = controle negativo; Pos puro = controle positivo puro.

Usuários 1, 2 e 3 = identificação da amostra de cada usuário.



**Figura 8a** – Diluição da amostra em lâmina.



**Figura 8b** – Diluição da amostra em tubos.

3. Pipete no 2º círculo 50µl do soro controle positivo;
4. Homogeneíze a suspensão antigênica cuidadosamente, por inversão;
5. Aspire a suspensão antigênica até encher a seringa, retire o êmbolo, deixe cair algumas gotas para eliminar bolhas de ar e dispense exatamente uma gota em cada um dos círculos – do 1 ao 8;
6. Coloque a lâmina no agitador orbital e deixe agitar por 4 minutos a 180 rpm;
7. Faça a leitura da reação em microscópio óptico, imediatamente após o término da agitação. Utilize objetiva de 10X e ocular de 10X;
  - a) Utilize o resultado do controle negativo para determinar o padrão de ausência de reatividade;
  - b) O título da amostra será definido pela última diluição que apresentar reatividade.

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

Ao finalizar a reação você deverá transferir os resultados anotados no protocolo para o laudo. **As amostras reagentes devem ter o título reportado no laudo.**

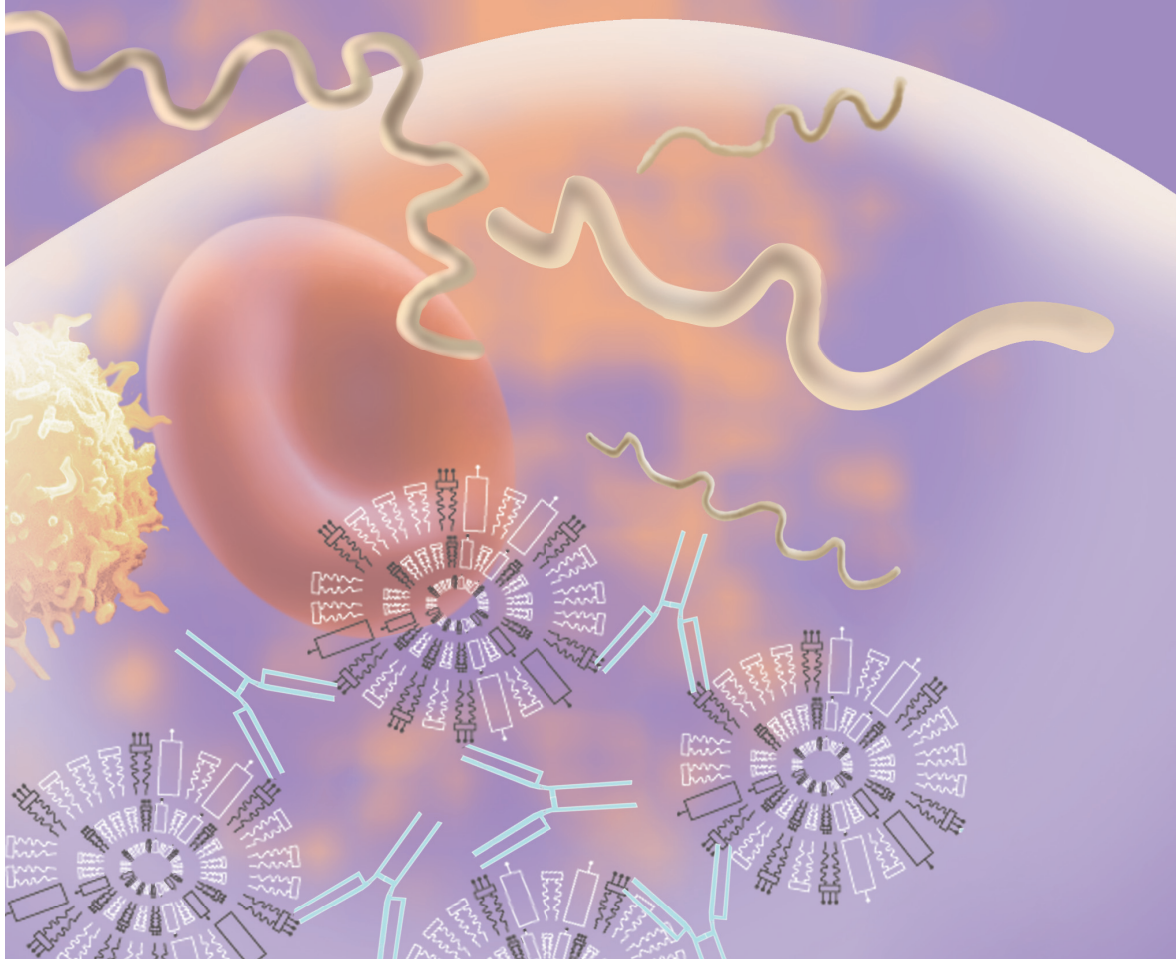
O laudo deverá:

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



### Atenção

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



## Capítulo 6

# A reação de VDRL em amostras de líquido





## A reação de VDRL em amostras de líquido

A realização do VDRL em amostras de líquido é uma ferramenta fundamental para o diagnóstico da sífilis congênita ou da neurosífilis.

Para analisar amostras de líquido o preparo do antígeno sofre algumas modificações, conforme você verá a seguir.



### Atenção

- Somente o VDRL pode ser utilizado para testar amostras de líquido.
- Não teste amostras de líquido com conjuntos diagnósticos que não tenham sido padronizados para utilização nesse tipo de amostra.
- Antes de realizar o teste, certifique-se de que o *kit* que você dispõe permite testar amostras de líquido.
- Leia as instruções do fabricante do produto antes de iniciar o teste.

## Cuidados com a amostra de líquido para fazer o VDRL

- A amostra de líquido deve ser centrifugada para sedimentar e remover hemácias ou contaminação bacteriana que podem estar presentes e causar interferência no teste.
- **A amostra de líquido não precisa ser inativada para a realização do VDRL.**

- Amostras de líquido turvas após a centrifugação ou com hemólise não são adequadas para o teste VDRL. Nesses casos, solicite uma nova amostra.
- Se não for possível obter nova amostra e, se houver concordância do médico que estiver assistindo o usuário, pode-se fazer um teste treponêmico. No entanto, se esse teste for reagente, deve-se obrigatoriamente fazer o VDRL para o acompanhamento do tratamento.

## Passo a passo do VDRL em amostras de líquido

### 1. Preparo da SUSPENSÃO ANTIGÊNICA MODIFICADA para uso em amostras de líquido

#### ***Materiais necessários:***

- Suspensão antigênica de VDRL preparada conforme detalhado na ação 3 e validada de acordo com a ação 6, no capítulo 5;
- Solução de NaCl 10% (10g de NaCl em 100ml de água destilada);
- Erlenmeyer de 25ml com tampa de vidro esmerilhado;
- Pipetas de volume ajustável entre 1,0ml e 5,0 ml ou pipetas de vidro de 2ml;
- Pêra ou macrocontrolador de pipetagem para pipetas de vidro;
- Recipiente para descarte de ponteiros ou recipiente com água e sabão neutro para colocar as pipetas de vidro utilizadas;
- Cronômetro;
- Caneta para escrever em vidro;
- Protocolo de trabalho.

#### ***Como fazer***

Execute os seguintes passos:



1. Misture, em um Erlenmeyer, uma parte de solução de **NaCl 10%** com uma parte da suspensão antigênica do VDRL previamente preparada e validada para utilização com amostras de soro.
2. Para testar entre 1 e 5 amostras de líquido misture 1,5ml de **NaCl 10%** com 1,5ml da suspensão antigênica.
3. Homogeneíze a solução de NaCl 10% e a suspensão antigênica por meio de suaves movimentos de rotação do Erlenmeyer.
4. Identifique o Erlenmeyer, anotando **“Suspensão antigênica para VDRL em Líquor”**, o horário e a data do preparo.
5. Deixe a mistura descansar por pelo menos 5 minutos antes do uso.
6. Utilize a suspensão antigênica modificada em **até 2 horas** após o preparo. Depois desse período descarte-a e, se houver necessidade de testar outras amostras de líquido, prepare uma nova suspensão modificada.

## 7. O teste de VDRL qualitativo em amostras de líquido

### ***Materiais necessários:***

- Suspensão antigênica modificada;
- Solução salina (NaCl 0,9%);
- Seringa de vidro de 1ml com agulha de calibre 22 G calibrada para 50 gotas com 0,5ml da suspensão antigênica ou pipeta de 10µl;
- Lâmina de vidro escavada com círculos côncavos de 14mm de diâmetro e 1,75mm de profundidade (lâminas de Kline);
- Agitador orbital, tipo Kline, ajustado para 180± 2rpm;
- Microscópio óptico comum (objetiva 10X e ocular 10X);
- Pipetas de volume ajustável entre 50µl e 200µl;
- Ponteiras descartáveis para volumes entre 50µl e 200µl;
- Caixa para descarte de ponteiras;

- Recipiente de vidro para descontaminação de produtos biológicos, contendo solução aquosa de hipoclorito de sódio: (uma parte de água sanitária comercial mais quatro partes de água) ou contendo álcool 70% (peso a peso – p/p);
- Caneta para escrever em vidro;
- Cronômetro;
- Protocolo de trabalho.



### Atenção

Para calibrar a agulha utilizada para pipetar a suspensão antigênica do VDRL no líquido você deve seguir os mesmos procedimentos detalhados anteriormente na ação 4 para o VDRL, no capítulo 5. Observe ainda que:

- O calibre da agulha é de 22G.
- A agulha estará calibrada se você contar 50 gotas ( $\pm 1$ ) para cada 0,5ml de suspensão antigênica modificada, correspondente a 10 $\mu$ l por gota.

### Como fazer

1. Organize seu protocolo de trabalho;
2. Pipete 50 $\mu$ l do líquido em uma demarcação da **lâmina escavada** de Kline;
3. Homogeneíze cuidadosamente a suspensão antigênica modificada;
4. Pipete **10 $\mu$ l** da suspensão antigênica modificada na demarcação da lâmina que contém o líquido;
5. Coloque a lâmina no agitador orbital durante **8 minutos**, com **agitação de 180 rpm**;
6. Faça a leitura da reação em microscópio óptico com objetiva de 10X e ocular de 10X, imediatamente após o término da agitação:

- a) Se não for observada floculação na amostra, a reação é negativa e o laudo pode ser emitido.
- b) Caso haja floculação na amostra de líquido puro, a **reação é positiva. É necessário fazer a reação quantitativa** por meio da diluição seriada do líquido em solução salina, para determinação do título.

## Reação de VDRL quantitativa no líquido

Faça diluições seriadas do líquido seguindo os mesmos procedimentos apresentados no item 2 da ação 8 deste manual.

Utilize a suspensão antigênica modificada para fazer o VDRL quantitativo em líquido.

A reação estará finalizada quando for possível estabelecer a última diluição do líquido que ainda apresentar reatividade. Essa corresponderá ao título que será reportado como o resultado final do teste.



### Atenção

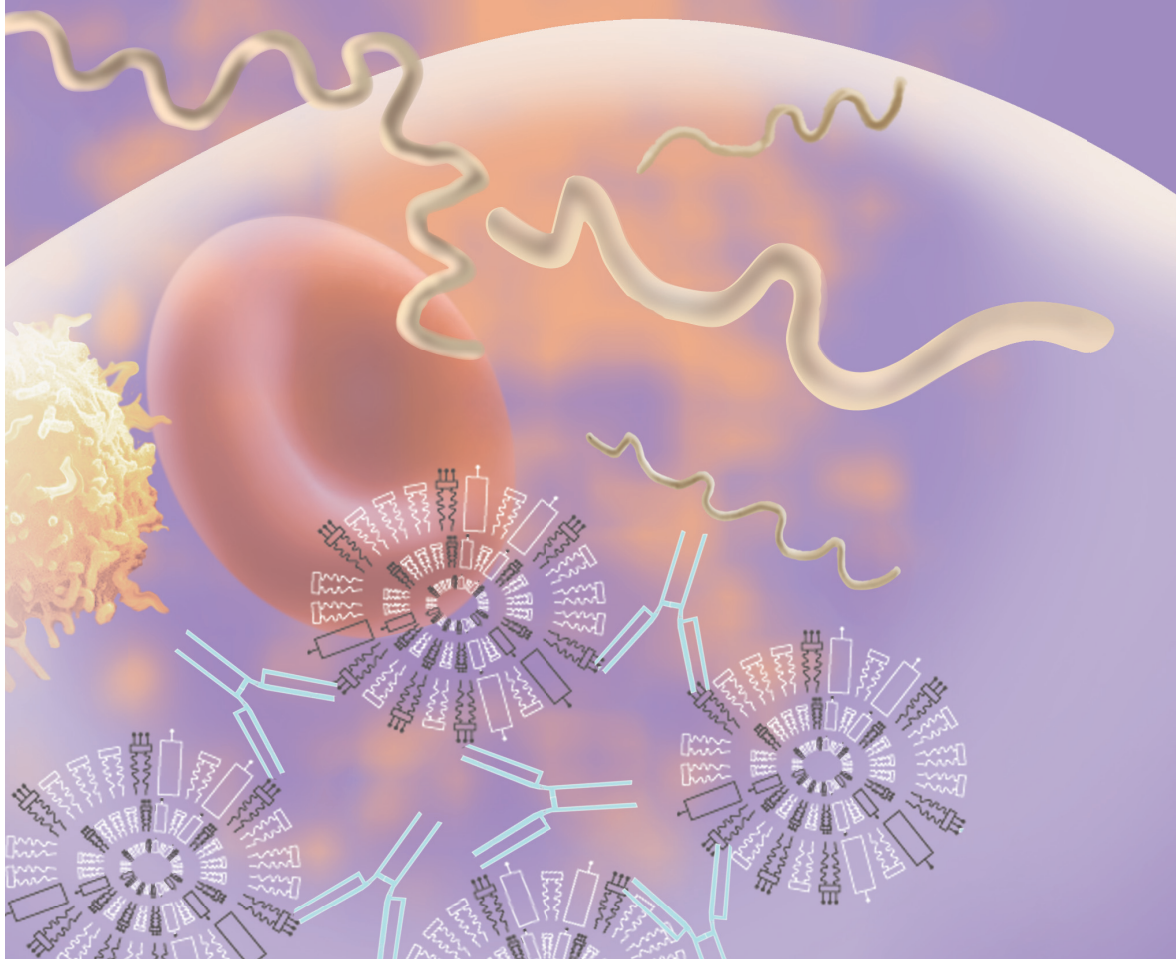
- Utilize 10µl de suspensão antigênica modificada;
- A reação deverá ser agitada a 180rpm por 8 minutos.

Diferenças entre VDRL no soro e VDRL no líquido		
	VDRL no soro	VDRL no líquido
Modificação da suspensão antigênica	Não	Sim
Estabilidade da suspensão antigênica	8 horas	2 horas
Volume da suspensão antigênica	17µl	10µl
Tempo de agitação da reação	4 minutos	8 minutos
Tipo de lâmina	Plana	Escavada



### **Atenção**

Os testes de floculação só devem ser realizados em ambientes com temperatura ambiente entre 23°C e 29°C. Temperaturas fora dessa faixa desestabilizam a reação, o que pode gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.



---

## Capítulo 7

# Controle de qualidade dos testes de floculação





## Controle de qualidade dos testes de floculação

Como bom profissional, você sabe que a qualidade dos resultados é fundamental na prática laboratorial. Para ter a garantia de que o seu trabalho foi executado corretamente, é importante adotar medidas de controle de qualidade que permitam avaliar a execução de cada etapa do trabalho realizado.

Neste capítulo você verá procedimentos que devem ser adotados para que os resultados produzidos sejam confiáveis e possam ser reproduzidos.

### Soros controle

#### Soros controle utilizados

Você deverá utilizar soros controle produzidos no seu laboratório ou adquiridos de fonte idônea, e não somente os soros controle dos conjuntos diagnósticos (*kit*), pois:

- Nem todos os conjuntos diagnósticos vêm com controles positivos e negativos.
- Os controles que acompanham os *kits* nem sempre têm volume suficiente para você realizar o teste quantitativo todas as vezes em que prepara a suspensão antigênica e testa suas amostras.
- Um laboratório dedicado às Boas Práticas sempre inclui soros controle produzidos no próprio estabelecimento. É importante que você registre, diariamente, os resultados obtidos com os seus controles. Desse modo, poderá observar qualquer alteração na qualidade do reagente que está utilizando ou problemas que ocorram na reação, tendo, assim, a possibilidade de tomar as providências cabíveis para corrigir o erro.

## Quando não há soros controle no kit

Nesses casos você deverá utilizar os soros controle preparados no próprio laboratório ou adquiridos de fonte idônea.

Se você estiver iniciando o diagnóstico da sífilis em seu laboratório e ainda não dispuser desse tipo de amostra, solicite a algum laboratório tecnicamente reconhecido que os envie.

### Prepare seus próprios controles

- Os soros controle positivos que você deve utilizar em sua rotina devem ter pelo menos três títulos distintos: um baixo (até 1/4), um médio (1/8 a 1/16) e outro alto (acima de 1/32).
- Armazene amostras reagentes obtidas da sua rotina;
  - Para confirmar o título das amostras da sua rotina teste-as em paralelo a amostras com títulos conhecidos.
  - Se os soros com reatividade conhecida reproduzirem o título esperado, os títulos das suas amostras serão considerados verdadeiros e elas poderão ser utilizadas como soros controle.
  - Prepare alíquotas desses soros com títulos conhecidos sem diluí-los, tendo o cuidado de identificá-los com: data, título e o número de alíquotas armazenadas. Utilize uma planilha própria para registrar e controlar a utilização e o estoque desses soros.
- Faça também alíquotas de amostras não reagentes.
- Lembre-se de preparar alíquotas dos controles em volume suficiente para apenas uma reação.
- Estoque-as em freezer a menos 20°C.
- Descongele diariamente apenas a alíquota necessária, que não deverá ser novamente congelada.
- Ao descongelar os controles não esqueça de homogeneizá-los antes de fazer a inativação ou a reinativação;
- Não misture amostras de soros positivos.





### Atenção

O procedimento de congelar e descongelar várias vezes um soro faz com que o título diminua.

## Cuidados com os soros controle

### 1. Determine o título do soro controle positivo antes de iniciar uma rotina com testes de floculação

A obtenção do título esperado para o soro controle é o que garante que:

- a suspensão antigênica foi corretamente preparada;
- os equipamentos e os insumos utilizados apresentam a qualidade desejada.
- Nos casos das suspensões antigênicas prontas para uso, a titulação garante que estão estáveis e adequadas para uso.

### 2. Quando o título dos soros controle não corresponde ao esperado

Se você não obtiver os títulos previamente definidos para os controles, e já tiver descartado a possibilidade de que o problema seja na qualidade da suspensão antigênica, verifique se:

- a velocidade de agitação da reação estava em  $180 \pm 2$  rpm;
- o tempo de agitação da reação foi o preconizado pelo fabricante do kit;
- a calibração da agulha ou da pipeta utilizada para dispensar a suspensão antigênica estava correta;
- a leitura foi feita imediatamente após o término da agitação;
- os procedimentos de lavagem do material empregado para fazer a reação foram adequados, pois resíduos de sabões e detergentes podem alterar os resultados da reação.

### 3. Teste do controle negativo em cada rotina com testes de floculação

Ao testar o soro controle negativo certifique-se de que a suspensão antigênica não apresenta flocos (grumos) grosseiros, que podem ser confundidos com reatividade da amostra no teste.

Observe primeiro o controle negativo para estabelecer o parâmetro de negatividade da reação antes de fazer a leitura dos resultados das amostras da sua rotina.

### Instruções para lavagem dos materiais utilizados nos testes não treponêmicos como o VDRL

Após a leitura do teste de VDRL, as lâminas devem ser colocadas em solução de álcool a 70% (p/p) ou hipoclorito de sódio a 1/5 (uma parte de hipoclorito de sódio comercial e quatro partes de água), para descontaminação.

Lembre-se que a suspensão antigênica é composta por lipídeos (cardiolipina, colesterol e lecitina), por isso a lavagem das lâminas do VDRL, da seringa calibrada e do Erlenmeyer deve seguir os procedimentos descritos a seguir:

#### Procedimentos para lavar materiais:

- Lave as vidrarias com água e sabão neutro, utilizando uma escova;
- Enxágue pelo menos 10X com água corrente;
- Enxágue de 5 a 10X com água destilada;
- Enxágue 1X com álcool absoluto; e
- Enxágue 1X com acetona;
- Deixe secar até que não haja qualquer resíduo de acetona;
- Guarde o material em local adequado para evitar poeira e arranhaduras nas lâminas de vidro.

## Recomendações para o teste RPR

A padronização deste teste DETERMINA que este seja realizado em cartões descartáveis, **de uso único**, com círculos de 18cm de diâmetro.

Infelizmente, existem fabricantes que não incluem esses cartões em quantidade suficiente para realização dos testes qualitativos e quantitativos e, por isso, alguns laboratórios os reutilizam. Esse procedimento é inadequado e contraria as Boas Práticas laboratoriais. Materiais descartáveis **devem ser descartados**.

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



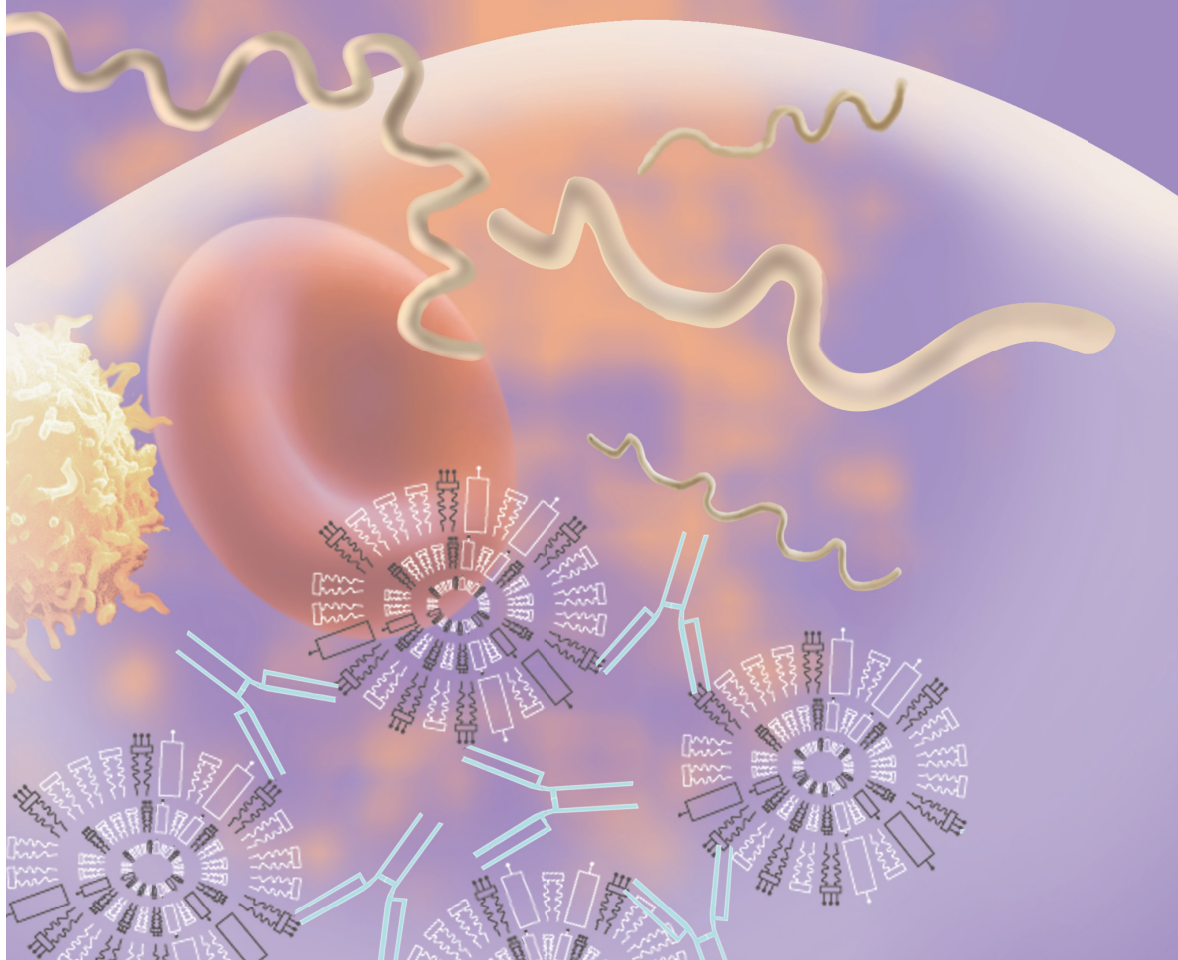
### Atenção

As recomendações acima valem também para o teste **TRUST**.

### Outras dicas para garantir a qualidade dos testes:

- Não use reagentes fora do prazo de validade estabelecido pelo fabricante;
- Não use testes sem registro na **ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- Faça o protocolo de trabalho com atenção;
- Anote a data e a hora dos ensaios;
- Siga rigorosamente as instruções do fabricante e nunca altere os volumes estabelecidos;
- Use sempre soros controle positivos e negativos;
- Monitore diariamente a temperatura ambiente e registre-a em formulário próprio;
- Monitore diariamente a temperatura do banho-maria e registre-a em formulário próprio;

- Providencie as manutenções preventivas e corretivas dos seus equipamentos. Aprenda mais sobre esse tema fazendo o **Curso: Equipamentos – utilização e monitoramento em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública** da série TELELAB;
- Participe de um programa de Avaliação Externa da Qualidade, conforme estabelecido na RDC Nº 302, de 13 de outubro de 2005.



---

Capítulo 8

## Testes treponêmicos





## Testes treponêmicos

Neste capítulo você conhecerá os testes treponêmicos mais utilizados, suas indicações de uso e as limitações dessas metodologias. Os testes treponêmicos – FTA-abs, MHA-TP/TPHA/TPPA e ELISA – foram desenvolvidos inicialmente para confirmar resultados positivos obtidos previamente com testes não treponêmicos.

Atualmente, os ELISA e suas variações, por permitirem automação, também são utilizados como testes de triagem em laboratórios ou em hemocentros que possuem grande rotina.

### Características gerais dos testes treponêmicos

Como dificilmente esses testes treponêmicos tornam-se não reagentes, é necessário que o médico investigue a história clínica do usuário e associe o resultado do teste treponêmico com o resultado do teste não treponêmico.

São testes **qualitativos**. Sua reatividade indica que o usuário teve contato com *Treponema pallidum* em alguma época de sua vida e desenvolveu anticorpos específicos. São indicados para confirmação do diagnóstico, quando a triagem é feita com um teste não treponêmico.

## Testes treponêmicos mais utilizados no Brasil

Teste treponêmico	Porque é utilizado
FTA-abs ( <i>Fluorescent treponemal antibody absorption</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ É considerado o teste de referência ou padrão ouro dentre os testes treponêmicos.</li> <li>■ Pode ser feito com amostras de soro ou plasma.</li> <li>■ É o primeiro teste a se tornar reagente após a infecção, tendo bom desempenho no diagnóstico da sífilis primária em usuários que apresentam o cancro duro com mais de 10 dias de evolução.</li> <li>■ É importante também para o esclarecimento do diagnóstico de usuários com evidência clínica de sífilis que apresentaram resultados não reagentes nos testes não treponêmicos, situação que pode ocorrer em amostras de pacientes com sífilis primária, latente recente ou tardia.</li> </ul>
Testes de hemaglutinação ou aglutinação indireta ou passiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ São de execução simples.</li> <li>■ Podem ser feitos em amostras de soro ou plasma.</li> <li>■ Não necessitam equipamentos para sua realização ou para a leitura dos resultados.</li> </ul>
Imunoenzimáticos – ELISA, incluindo os quimioluminescentes	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ São ensaios que podem ser automatizados e empregados em laboratórios que têm grande rotina.</li> <li>■ Podem ser feitos em amostras de soro ou plasma. Existem, ainda, <i>kits</i> padronizados para testar amostras de sangue seco em papel-filtro.</li> <li>■ A leitura dos resultados é feita por <b>espectrofotometria</b> <sup>G</sup> ou outros métodos automatizados.</li> </ul>
Testes Rápidos – TR	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Não necessitam de estrutura laboratorial para serem executados.</li> <li>■ Podem ser feitos em amostras de sangue total, soro ou plasma.</li> <li>■ Entre a coleta da amostra e a emissão do resultado decorrem cerca de <b>30 minutos</b>.</li> </ul>

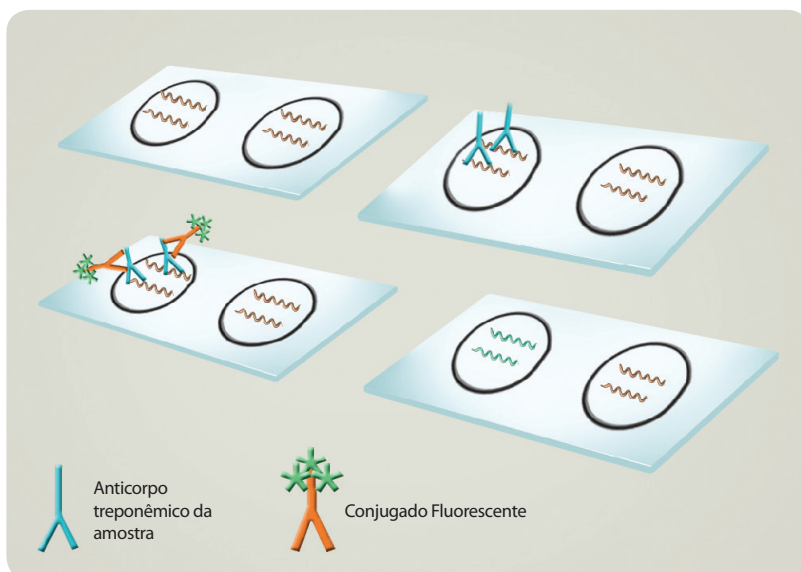


## TESTE FTA-abs (*Fluorescent treponemal antibody – absorption*)

### Princípio Metodológico da Reação de FTA-abs

A reação de FTA-abs é uma técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Utiliza *Treponema pallidum* fixado em áreas demarcadas de lâminas de vidro em que são feitas as reações.

Veja na Figura 9 a representação do seu princípio metodológico.



**Figura 9** – Representação esquemática de uma reação de imunofluorescência indireta.

### A reação de FTA-abs

1. No FTA-abs, o antígeno utilizado é *Treponema pallidum* subsp *pallidum* (cepa Nichols), que é fixado nas demarcações de uma lâmina de vidro.
2. A amostra de soro utilizada deve ser inativada a 56°C por 30 minutos.

3. As diluições são feitas em tubo, (a amostra é diluída a 1/5 misturando-se 1 parte de soro e 4 partes de solução absorvente ou *sorbent* – extrato de cultura de *treponema* Reiter não patogênico). Essa diluição é feita para remover anticorpos treponêmicos comuns à maioria dos treponemas não patogênicos que podem estar presentes no soro.
4. A amostra diluída é colocada sobre a demarcação da lâmina. Se a amostra contiver anticorpos antitreponema *pallidum*, esses se ligarão aos treponemas fixados na lâmina.
5. Após a incubação da reação e lavagem da lâmina para remover anticorpos e outros componentes da amostra que não se ligaram à reação, é adicionado o **conjugado fluorescente** (soro anti-imunoglobulina humana conjugado ao isotiocianato de fluoresceína);
6. Se houver anticorpos na amostra ligados aos treponemas fixados na lâmina, o conjugado se ligará aos anticorpos, tornando os treponemas fluorescentes. Esses poderão, então, ser vistos em microscopia de fluorescência, emitindo luz verde maçã.



### Atenção

Utilize sempre um controle positivo e um controle negativo em toda a lâmina de FTA-abs.

## Leitura e Interpretação da Reação de FTA-abs

Os resultados possíveis são:

- **REAGENTE:** quando os treponemas ficam fluorescentes (emitem cor de maçã verde) sob microscopia de imunofluorescência;
- **NÃO-REAGENTE:** quando os treponemas apresentam uma coloração avermelhada ou cor verde pálida, sem sinal de fluorescência;
- **INCONCLUSIVA:** quando há presença de treponemas com baixa intensidade de fluorescência, quando são observadas reações com pontos de fluorescência nos treponemas, ou ainda quando se observam, no mesmo campo, treponemas fracamente fluorescentes e treponemas com coloração avermelhada.

## Dicas para resolver o problema dos resultados inconclusivos

1. Se os padrões de reatividade dos controles não estiverem de acordo com os esperados, recomenda-se verificar:
  - O tempo e a temperatura utilizados para inativar a amostra. Nesses casos teste novamente a amostra após a correção do problema;
  - Se a amostra foi congelada e descongelada várias vezes, o que pode ter causado diminuição ou perda de reatividade. Nesse caso, solicite uma nova amostra.
2. Se os padrões de reatividade dos controles não estiverem de acordo com os esperados, recomenda-se verificar se:
  - O antígeno contém muitos restos celulares e/ou outros contaminantes biológicos;
  - Os conjugados fluorescentes podem ter perdido a marcação com a fluoresceína ou apresenta contaminação bacteriana ou fúngica. Nesses dois casos se observa intensa fluorescência inespecífica;
  - O tempo e a temperatura de incubação da reação foram os recomendados pelo fabricante;
  - As condições do microscópio e da lâmpada de fluorescência;
  - O pH da salina tamponada com fosfato utilizada para a lavagem das amostras está em  $7,2 \pm 0,2$ .



### Atenção

Se houver constatação de que há problemas com o **antígeno de *T. pallidum*** ou com o **conjugado fluorescente**:

- Primeiro, descarte os problemas de má conservação e de prazo de validade vencido dos reagentes.
- Caso tudo esteja correto, entre em contato com o fornecedor e solicite a troca do reagente problema.

Se após a adoção dessas medidas o resultado permanecer inconclusivo, sugere-se o uso de outra metodologia e, se possível, a coleta de uma nova amostra.

### Reagentes e insumos para o FTA-abs

Atualmente, os testes são apresentados na forma de conjuntos diagnósticos (*kits*), que geralmente incluem:

- lâminas contendo os antígenos já fixados, embaladas individualmente;
- conjugado fluorescente com o título pré-determinado;
- solução **adsorvente**<sup>G</sup> ou *sorbent*;
- os soros controle positivos e negativos; e
- solução concentrada de salina tamponada com fosfato (PBS) para a lavagem das lâminas.

Esses reagentes e insumos podem ser adquiridos separadamente. Nesse caso, se o **antígeno** for **liofilizado**, esse deve ser reconstituído e fixado nas lâminas. O conjugado adquirido deve ser titulado para determinar a diluição ideal e a solução salina tamponada deve ser preparada no laboratório.

Lembre-se que você deve produzir soros controle a partir das amostras da sua rotina e utilizá-los em todas as lâminas ao fazer o teste das amostras dos usuários.



#### Atenção

Utilize ponteiros estéreis na preparação do conjugado para evitar sua contaminação.

## Testes MHA-TP (Micro-hemaglutinação para *Treponema pallidum*) e da aglutinação indireta

### Princípio metodológico da reação de MHA-TP

O teste de hemaglutinação indireta ou passiva baseia-se na ligação dos anticorpos treponêmicos presentes no soro com hemácias que contêm, na sua superfície, antígenos de *Treponema pallidum* (cepa Nichols).

Os anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos que estão na superfície das hemácias, resultando na hemaglutinação.

Na reação de aglutinação indireta, os antígenos de *Treponema pallidum* são adsorvidos à superfície de partículas de gelatina. Os anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos de várias partículas de gelatina, resultando na aglutinação.

#### Dicas:

Antes de iniciar a reação, leia atentamente as recomendações do fabricante do *kit* quanto à necessidade de:

- inativar o soro;
- diluir a amostra com solução adsorvente ou *sorbent*;
- utilizar 2 – mercaptoetanol para adsorver fator reumatóide ou outros interferentes da reação;
- utilizar controles com hemácias ou partículas de gelatina sem antígenos na sua superfície.

Além disso:

- retire a eletricidade estática da placa de reação, passando uma gaze úmida embaixo desta antes de iniciar a incubação, para evitar resultados falso-positivos;
- incube a reação em local onde não haja vibração, para evitar que ligação dos anticorpos às hemácias ou às partículas de gelatina seja desfeita, o que causa resultados falso-negativos.



### Atenção

Lembre-se que você não pode reutilizar as placas de microtitulação para fazer esta reação. Placas usadas devem ser descartadas.

## Leitura e interpretação da reação de hemaglutinação ou de aglutinação

Os resultados possíveis são:

- **REAGENTE:** quando há hemaglutinação (ou aglutinação) se forma uma **rede** ou **“tapete”** de hemácias (ou de partículas de gelatina) unidas aos anticorpos e que se espalha por toda a superfície do poço da placa em que foi realizada a reação.



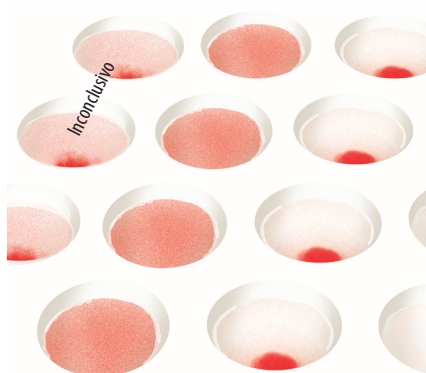
**Figura 10** – Hemaglutinação reagentes.

- **NÃO REAGENTE:** quando não há hemaglutinação, as hemácias (ou as partículas de gelatina) se depositam e formam um **botão compacto**, no fundo do poço da placa em que foi realizada a reação.



**Figura 11** – Hemaglutinação não reigente.

- **INCONCLUSIVO:** neste caso, não há formação completa da hemaglutinação, nem do botão, por isso se observa um misto dos dois, não sendo possível definir se a amostra é reagente ou não reagente. Quando isso ocorre o teste deve ser repetido.



**Figura 12** – Hemaglutinação inconclusiva.

## Teste treponêmico imunoenzimático ELISA ou de quimioluminescência

Os testes imunoenzimáticos e suas variações como, por exemplo, o método de quimioluminescência, são testes treponêmicos que utilizam **antígenos recombinantes** <sup>G</sup> de *Treponema pallidum* fixados em uma fase sólida. A esses antígenos se ligarão os anticorpos presentes na amostra do usuário.

As reações devem ser feitas sempre de acordo com as instruções dos fabricantes porque existem variações na forma de revelar os anticorpos das amostras que se ligaram aos antígenos fixados.

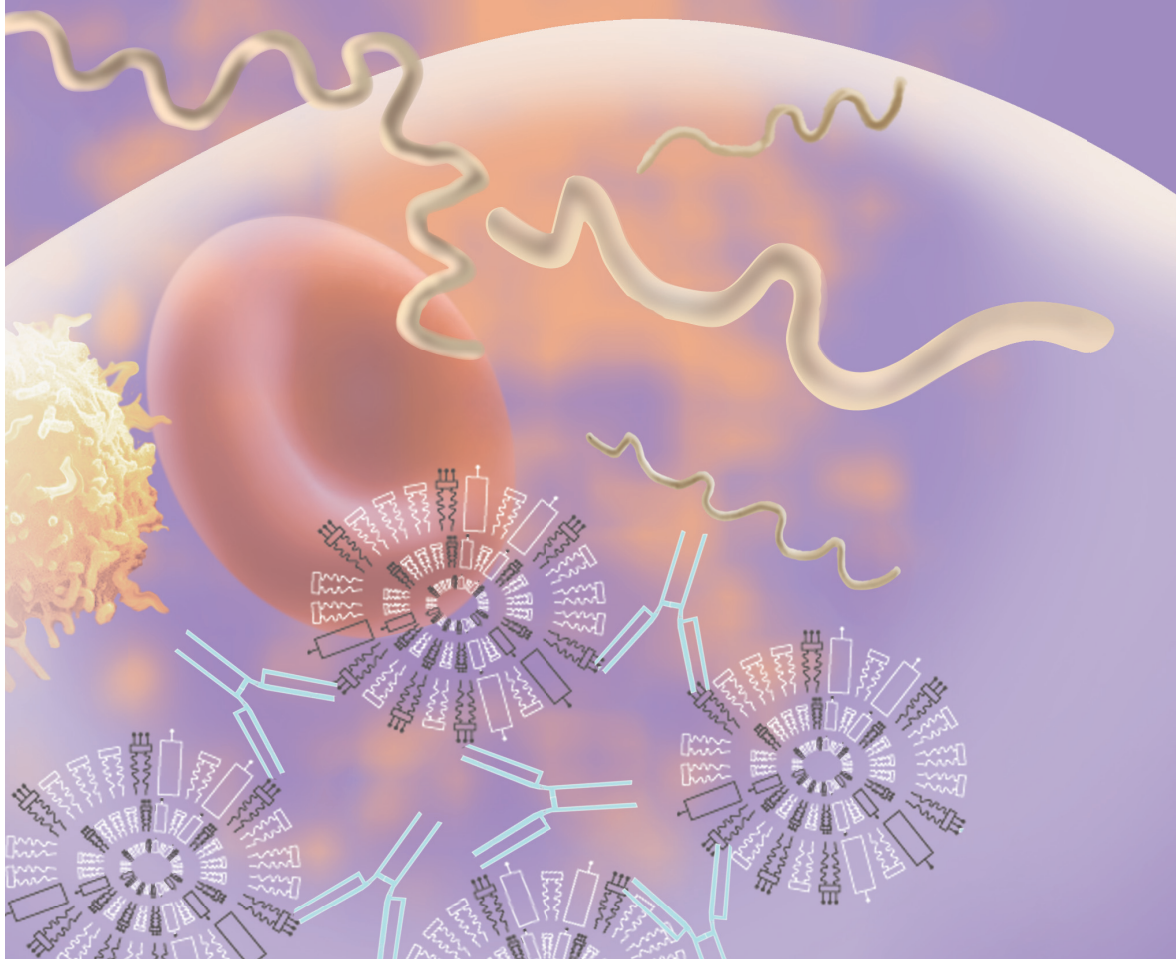
Essas reações são semi ou totalmente automatizadas e necessitam de equipamentos específicos.



### Saiba mais

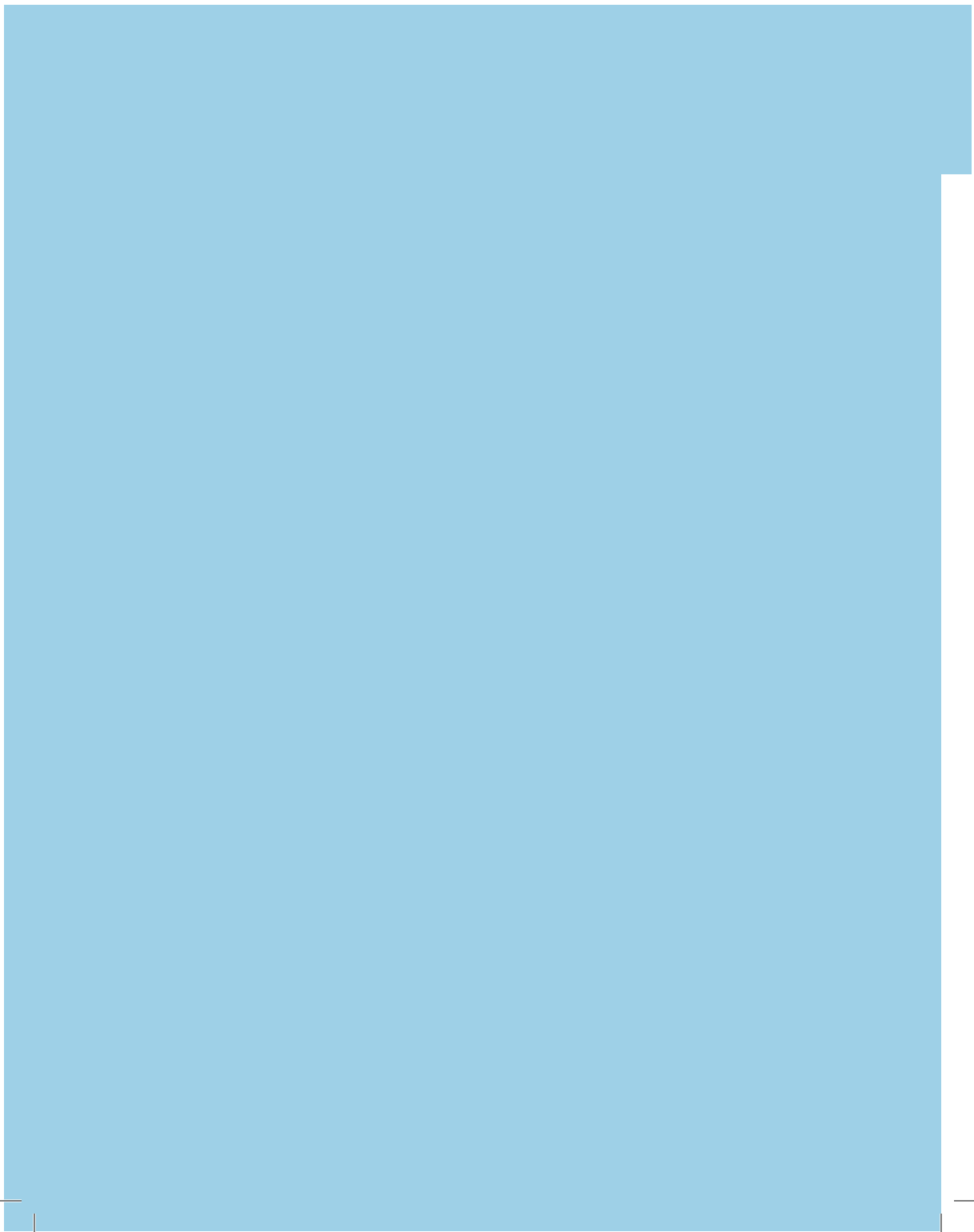
Para conhecer o princípio metodológico dos testes ELISA e de Quimioluminescência faça o curso da Série **TELELAB – HIV – Estratégias para diagnóstico no Brasil**.





Capítulo 9

## Testes rápidos para sífilis





## Testes rápidos para sífilis

Pela simplicidade de execução, facilidade e rapidez na leitura, os TR para sífilis fazem parte das estratégias do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais para ampliar a cobertura diagnóstica da sífilis.

Testes rápidos são todos os testes cuja execução, leitura e interpretação do resultado são feitas em, no máximo, 30 minutos, sem a necessidade de estrutura laboratorial. A leitura dos resultados é feita a olho nu.

Dependendo do fabricante, os testes rápidos para diagnóstico da sífilis podem ser feitos com amostras de **sangue total, soro ou plasma**.

Recentemente, os testes rápidos treponêmicos tornaram-se disponíveis no mercado brasileiro e apresentam valores de sensibilidade e de especificidade adequados para o diagnóstico laboratorial da sífilis.

Por serem de fácil execução podem ser utilizados para ampliar o acesso ao diagnóstico em:

- populações que residem em locais de difícil acesso.
- localidades nas quais os serviços de saúde não possuem adequada estrutura laboratorial.
- situações emergenciais como, por exemplo, em maternidades, no atendimento de parturientes que não fizeram o seguimento pré-natal.

Nos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTAs) a utilização de TR para o diagnóstico da sífilis possibilita a liberação do resultado do teste logo após a coleta da amostra, permitindo que as orientações e o tratamento específico sejam instaurados imediatamente.



### Saiba mais

Acompanhe no site do Departamento de DST, Aids e Hepatites virais – [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br) – a legislação vigente para a utilização dos testes rápidos.

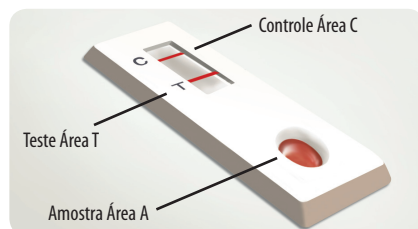
## Princípios metodológicos dos testes rápidos – TR – para diagnóstico da sífilis

Os testes rápidos comercializados no Brasil e registrados na ANVISA utilizam o princípio metodológico de imunocromatografia ou fluxo lateral, para a detecção de anticorpos treponêmicos.

Dentro do mesmo princípio metodológico pode haver variações, e os resultados podem ser visualizados na forma de um ponto ou de uma linha.

Veja a seguir um exemplo de um teste, com o resultado em linha:

1. A fase sólida é uma tira de nitrocelulose.
2. A tira contém:
  - Um local para colocar a amostra e a solução tampão, chamada de **área A**;
  - Uma área intermediária contendo conjugado composto de antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* ligados ao corante selenium coloidal;
  - Uma outra área que contém antígenos de treponema imobilizados, para leitura do resultado chamada de **área T**;
  - Uma terceira área que contém um conjugado de anti-imunoglobulina (IgG) e ouro coloidal ou de antiproteína A recombinante e ouro coloidal para controle da reação e para validação do testes, chamada de **área C**.



**Figura 13** – Dispositivo para TR por imunocromatografia ou fluxo lateral.

3. A amostra é colocada na **área A** e, em seguida, é adicionada a solução tampão;
4. Os anticorpos da amostra fluem lateralmente pela fita de teste e ligam-se ao conjugado. Os anticorpos ligados ao conjugado continuam fluindo pela fita até a **área T** e ligam-se nos antígenos imobilizados, resultando no aparecimento de uma linha colorida;
5. O fluxo continua e frações do conjugado que não se ligaram na área T vão ser revelados na **área C**, produzindo uma linha vermelha. Essa linha é o controle da reação, sempre deve estar presente e indica que houve perfeita migração da amostra na tira de reação.

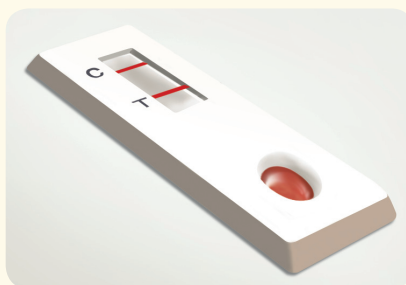
## Leitura do teste rápido para sífilis

Faça a leitura do seguinte modo:

1. Observe se houve a formação de uma linha colorida na **área C**. A presença desta linha valida o teste e indica que não houve problema com a reação.
2. Em seguida, faça a leitura do resultado da amostra observando se houve ou não a formação de uma linha colorida na **área T**.

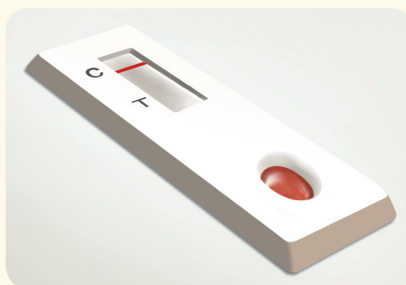
Os resultados possíveis são:

**REAGENTE:** quando há formação de uma linha colorida na área T e outra na área C. Um resultado positivo indica que há anticorpos antitreponema detectáveis na amostra do indivíduo.



**Figura 14a** – Exemplo de TR Reagente para Sífilis.

**NÃO REAGENTE:** quando há formação de linha colorida apenas na área C. Um resultado negativo indica que não há anticorpos antitreponema detectáveis na amostra do indivíduo.



**Figura 14b** – Exemplo de TR Não Reagente para Sífilis.



### **Atenção**

Se **não houver** formação de linha colorida na área C o teste é **INVÁLIDO**, independentemente do resultado obtido na área T. Nesse caso o teste deve ser repetido.

### **Como proceder se o resultado do teste for inválido:**

- Repita o teste. Caso o resultado continue inválido, faça o teste com um *kit* de outro lote ou de outra marca; ou
- Considere que:
  - a) amostras coaguladas ou lipêmicas podem interferir nos resultados;
  - b) que os volumes da amostra e do tampão estavam incorretos;
  - c) que os tempos de todas as etapas não foram rigorosamente respeitados.
- Faça um teste treponêmico como o FTA-abs, hemaglutinação ou imunoenzimático;
- Verifique as condições de estocagem do *kit* e o prazo de validade;
- Informe prontamente ao fornecedor caso haja persistência de resultados inválidos, pois esses sugerem problemas no *kit*.



### Atenção

- Não utilize *kits* com prazo de validade vencido.
- Lembre-se que os componentes do *kit* podem ter prazos de validade diferentes. Todos os itens devem ser verificados antes de sua utilização.
- Não misture componentes provenientes de *kits* ou caixas de lotes diferentes.
- Utilize os volumes corretos da amostra e dos outros reagentes.

## A escolha do teste rápido

Antes de decidir, faça contato com vários fabricantes de testes que estejam registrados na ANVISA e solicite a bula de cada produto. Estes testes estão disponíveis comercialmente em variados formatos para analisar amostras de sangue total, de plasma e de soro. Verifique quais os tipos de amostras definidas pelo fabricante do conjunto diagnóstico que você pretende utilizar antes de fazer sua escolha.



### Saiba mais

Para saber quais *kits* estão registrados:

- acesse o site [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).
- Clique em PRODUTOS PARA SAÚDE.

Além disso, para a escolha considere também:

- Qual amostra pode ser utilizada no teste e se a sua estrutura de coleta é adequada;
- A quantidade diária de testes que você irá realizar;
- Condições para estocar as amostras coletadas por punção venosa, caso você pretenda utilizar este tipo de amostra;

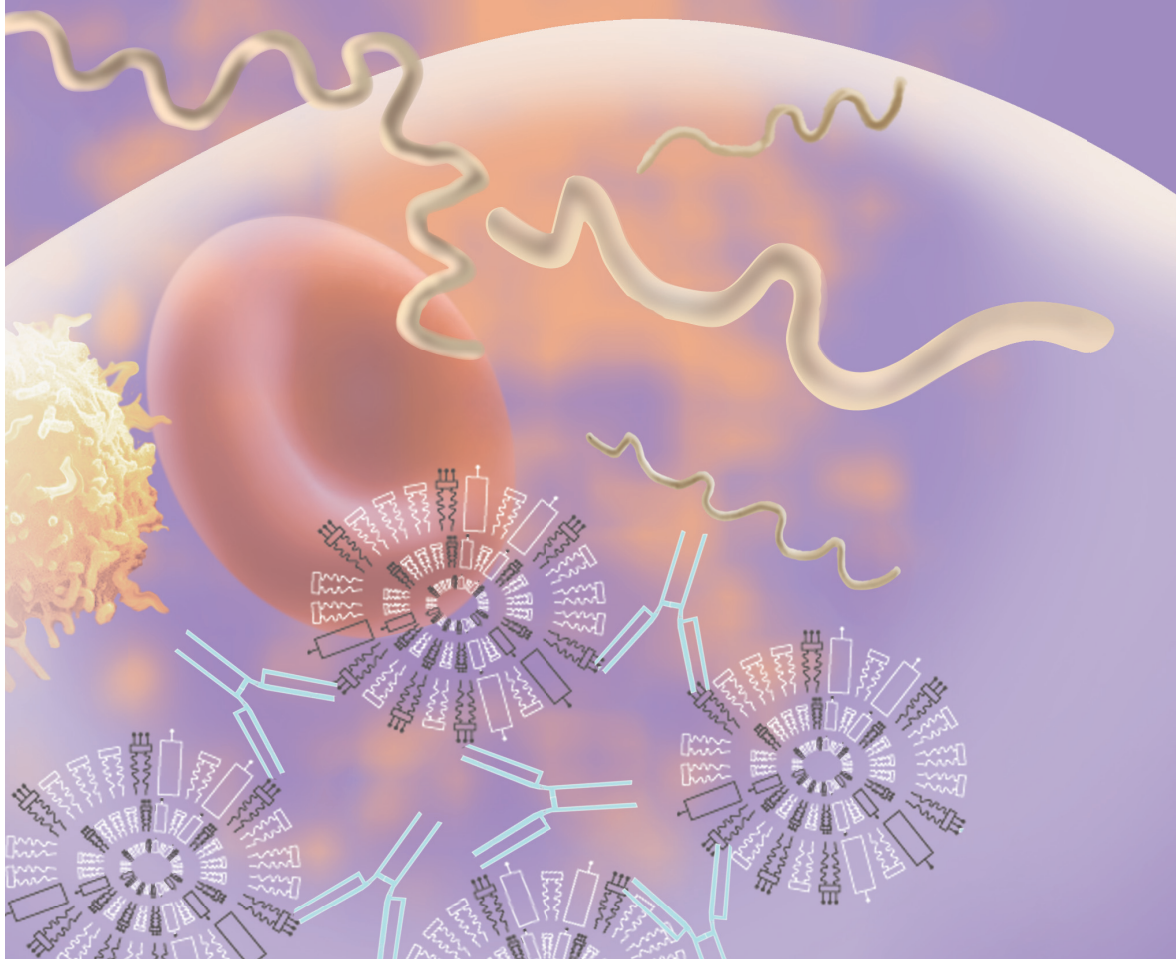
- Local adequado e pessoal treinado para coletar a amostra.



### **Atenção**

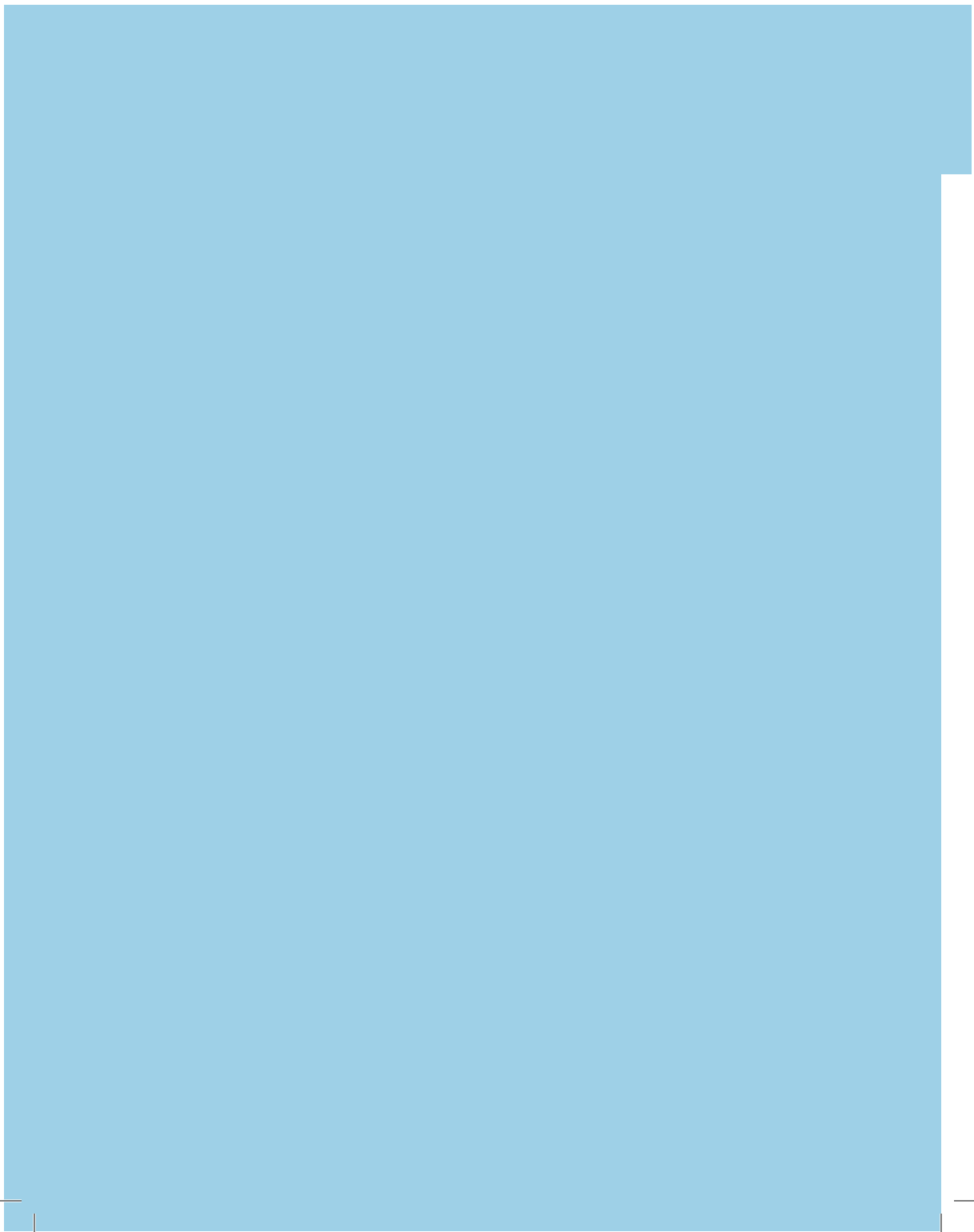
As amostras obtidas por punção digital podem ser colhidas em qualquer local, desde que respeitadas as normas de biossegurança: uso de EPI, antissepsia das mãos e do local da punção, entre outros.





## Capítulo 10

# Interpretação dos resultados dos testes de sífilis





## Interpretação dos resultados dos testes de sífilis

Os testes laboratoriais para o diagnóstico da sífilis devem ser feitos em duas etapas, uma de triagem e outra confirmatória.

Independentemente da sistemática de trabalho adotada em seu serviço para a triagem das amostras é fundamental que toda amostra reagente seja submetida a um teste não treponêmico quantitativo e a um teste treponêmico.

### Como deve ser a interpretação dos resultados

Embora os resultados dos testes laboratoriais sejam interpretados pelo médico, em associação com os dados da história clínica do usuário e com os dados epidemiológicos, é importante saber:

- **Teste não treponêmico reagente e teste treponêmico reagente** → podem significar sífilis ativa, sífilis latente ou sífilis tratada.

**O QUE FAZER:** para esclarecer o caso, deve-se analisar a história do usuário (dados clínicos e epidemiológicos);

- **Teste não treponêmico reagente (geralmente em títulos baixos) e Teste treponêmico não reagente** → **Improvável que seja sífilis.**

**O QUE FAZER:** neste caso se deve investigar doenças autoimunes, crônicas ou outras doenças infecciosas agudas e ainda outras situações fisiológicas e biológicas que o médico considerar pertinentes para explicar a positividade do teste não treponêmico;

- **Teste não treponêmico não reagente e Teste treponêmico reagente** → pode significar sífilis primária (com possível presença do cancro) ou sífilis tratada.

**O QUE FAZER:** o médico deve examinar o usuário buscando a lesão primária e verificar a história clínica e epidemiológica.

- **Teste não treponêmicos e teste treponêmico não reagentes** → provavelmente o usuário não tem sífilis ou a infecção é muito

recente e os anticorpos ainda não são detectáveis pelos testes utilizados.

**O QUE FAZER:** caso persista a suspeita clínica os testes devem ser repetidos após cerca de 20 a 30 dias.

## Cicatriz sorológica e baixos títulos

Cicatriz sorológica é o termo utilizado para as situações nas quais o usuário, comprovadamente tratado, ainda apresenta reatividade nos testes. Nestes casos, os testes treponêmicos são geralmente reagentes e os testes não treponêmicos quantitativos apresentam baixos títulos.

É um erro considerar **títulos baixos** apenas como cicatriz sorológica ou como reação falsamente positiva. Só é possível determinar que se trata de cicatriz sorológica quando for comprovado que o usuário teve sífilis e realizou tratamento adequado.



### Atenção

Títulos baixos também são encontrados:

- na sífilis primária, quando os anticorpos estão circulando em baixas concentrações.
- na sífilis latente não tratada.

## Como avaliar a resposta ao tratamento da sífilis

Somente os **testes não treponêmicos quantitativos** são indicados para avaliar a eficácia do tratamento da sífilis.

Recomenda-se sua realização a cada seis meses, até o final do segundo ano após o tratamento.

## Negativação dos testes não treponêmicos

- Quanto mais precoce for o tratamento após a infecção, mais rapidamente haverá desaparecimento dos anticorpos circulantes, com a consequente negativação dos testes não treponêmicos ou ainda sua estabilização em títulos baixos.

- Para a maioria dos usuários tratados, espera-se que haja reversão dos resultados, e que os testes tornem-se não reagentes entre 6 e 30 meses após o tratamento.
- Entretanto, na sífilis **tratada tardiamente** os testes podem nunca se negativar, persistindo a detecção de anticorpos em títulos baixos. A sorologia quando se apresenta repetidamente reagente em títulos baixos em usuários corretamente tratados não tem significado clínico.
- Segundo a literatura, os títulos diminuem cerca de quatro vezes após três meses e oito vezes aos seis meses após o tratamento. Outros autores relataram que o teste permaneceu reagente nas seguintes percentagens, de acordo com o tempo de tratamento:

**Percentual de reatividade nos testes não treponêmicos no monitoramento do tratamento da sífilis.**

Tempo	6 meses	12 meses	30 meses
Pacientes tratados com sífilis primária	16,5%	11,4%	6,6%
Pacientes tratados com sífilis secundária	27,6%	17,0%	8,4%

- Durante o monitoramento do tratamento, o **aumento de dois ou mais títulos** no teste sugere reinfeção ou tratamento inadequado.



### Atenção

A infecção pelo *Treponema pallidum* não confere imunidade, por isso um indivíduo pode contrair sífilis tantas vezes quantas for exposto ao agente etiológico.

## Limitações dos testes treponêmicos

- **Não podem ser utilizados no monitoramento de tratamento.** Cerca de 85% de amostras de indivíduos adequadamente tratados permanecem positivas nos testes treponêmicos durante muitos anos e, em alguns casos, durante toda a vida.
- Aproximadamente 1% da população em geral apresenta reações falsamente positivas nos testes treponêmicos.

## Outros cuidados necessários

Lembre-se sempre da sua segurança. Utilize os equipamentos de proteção individual quando for colher amostras de sangue ou realizar os testes:

- Avental ou jaleco de comprimento abaixo dos joelhos, com mangas longas, sistema de fechamento nos punhos por elástico ou sanfona e fechamento até a altura do pescoço;
- Protetor facial ou óculos de proteção e máscara;
- Luvas descartáveis;
- Sapatos fechados;
- Calças compridas.

Para que você possa trabalhar observando todos os cuidados de biossegurança faça o curso do Sistema TELELAB: **Biossegurança** e aprenda mais sobre este tema.



### Atenção

Não descuide de sua própria segurança. Lembre-se que você vai lidar com material potencialmente infectante.



**Figura 15** – Equipamentos de proteção individual.



## Glossário

- **Adsorvente:** fixação de moléculas a uma superfície sólida.
- **Antígenos recombinantes:** são produtos antigênicos obtidos por meio de tecnologia de DNA recombinante.
- **Cardiolipinas:** é um lipídio encontrado em baixas concentrações em tecidos de mamíferos. A cardiolipina sódica obtida de coração de boi é utilizada no preparo do antígeno VDRL.
- **Conjugado:** é um reagente formado por duas moléculas ligadas, como por exemplo, o fluorocromo – isotiocianato de fluoresceína ligado à molécula de imunoglobulina utilizada na reação de FTA-abs.
- **Espectrofotometria:** é um método óptico de leitura de reações que utiliza diferentes filtros para determinar a presença e/ou a quantidade de um analito. O equipamento utilizado é o **espectrofotômetro**.
- **Inativação:** é o procedimento de aquecer as amostras biológicas (por ex. soro) a 56° C durante 30 minutos para destruir ou tornar inativo os componentes termossensíveis do sistema complemento, para que este constituinte presente no sangue não interfira no desempenho da reação antígeno-anticorpo *in vitro* (nos testes sorológicos).
- **Liofilização:** é um processo de desidratação usado para preservar alimentos perecíveis, princípios ativos, bactérias etc. São congelados e a água é retirada por sublimação, sem que passem pelo estado líquido.
- **Resposta imune humoral:** refere-se à produção de anticorpos pelo sistema imune em resposta a um antígeno.







## Referências

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

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

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

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

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

BROWN, S.T.; ZAIDI, A.; LARSEN, S.A., REYNOLDS, G.H. Serological response to syphilis treatment. A new analysis of old data. **JAMA.** 1985; 253:1296-9.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LÖWHAGEN, G.B. **Syphilis: test procedures and therapeutic strategies.** **Semin Dermatol.** 1990;9:152-9.

MARRAZZO, J. Syphilis and other sexually transmitted diseases in HIV infection. **Top HIV Med.** 2007;15:11-6.

MÜLLER, I.; BRADE, V.; HAGEDORN, H.J.; STRAUBE, E.; SCHÖRNER, C.; FROSCH, M. et al. Is serological testing a reliable tool in laboratory diagnosis of syphilis? Meta-analysis of eight external quality control surveys performed by the german infection serology proficiency testing program. **J Clin Microbiol.** 2006;44:1335-41.

PODWINSKA, J. Syphilis and Aids. **Arch Immunol Ther Exp Warsz.** 1996; 44:329-33.

REBECCA, E.; LAFOND e SHEILA, A. LUKEHART. **Clinical Microbiology Reviews**. January 2006, p. 29-49, vol. 19, n. 1.

SIGNORINI, D.J.; MONTEIRO, M.C.; DE SÁ, C.A.; SION, F.S.; LEITÃO NETO, H.G.; LIMA, D.P.; et al. Prevalência da co-infecção HIV-sífilis num hospital universitário da cidade do Rio de Janeiro em 2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2007; 40:282-5.

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

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

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

