

VDRL BRÁS

1. FINALIDADE

Antígeno para a triagem sorológica da sífilis.

2. INTRODUÇÃO

O *Treponema pallidum*, agente causador da sífilis, induz o organismo a formar dois tipos de anticorpos, os não treponêmicos ou reaginas (*inespecíficos*) e os treponêmicos (*específicos*). O teste VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) desenvolvido por Harris, Rosenberg e Riedel na década de 40 é capaz de detectar anticorpos inespecíficos ou reaginas, presentes no soro de pacientes com infecção sífilítica, o que permite seu emprego em larga escala como prova de triagem sorológica para sífilis. A leitura final da prova é feita ao microscópio.

3. IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A maior importância clínica na reação de VDRL e seus derivados como o RPR BRÁS, está na *triagem sorológica* da sífilis, uma vez que à exceção da fase imediata ao contágio, as demais fases da sífilis produzem reaginas. Uma vez que outras patologias podem induzir a formação de reaginas, toda e qualquer amostra reagente ao VDRL deve ser submetida a pesquisa de anticorpos treponêmicos (*específicos*) tal como a prova do FTA-Abs, antes de se confirmar o diagnóstico sorológico da sífilis.

4. AMOSTRA

a- Preparo do paciente

Como a lipemia pode interferir na reação, recomenda-se a coleta da amostra após um jejum de 8 - 12h.

b- Tipos de amostra

- **Soro:** usar soro recém-coletado separado o mais rapidamente possível após a coleta, sem hemólise e não lipêmico, inativado a 56 °C por 30 min antes do uso (devendo ser reativado nesta temperatura por 10 minutos caso se demore mais que 4h para executar a prova);
- **LCR:** usar LCR isento de contaminações e centrifugado antes da análise (não devendo ser aquecido ou inativado).

c- Armazenamento e estabilidade

As amostras de soro podem ser mantidas em geladeira (2-8 °C) por um período de até 5 dias, do contrário, manter a amostra em freezer (-20 °C). As amostras de LCR devem ser analisadas o mais rapidamente possível após a coleta.

d- Critérios de rejeição

As amostras de soro que apresentarem hemólise, lipemia ou sinais de contaminação microbiana devem ser rejeitadas. A amostra de LCR caso apresente sinais de contaminação microbiana ou alta quantidade de sangue deve ser rejeitada.

e- Precauções e cuidados especiais

- Evitar congelamento e descongelamento freqüentes em uma mesma amostra;
- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infecto-contagiosas (hepatite, SIDA etc.). Seu descarte deve ser feito preferencialmente após sua autoclavagem devendo-se evitar sua eliminação diretamente no meio ambiente. Igual cuidado se recomenda no descarte de outros materiais como ponteiros plásticos, agulhas e seringas.

5. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Registro no Ministério da Saúde: 100.970.10032.

b- Princípio de técnica

A amostra em análise é colocada em contato com a suspensão antigênica de VDRL-BRÁS em uma lâmina apropriada, e submetida a um processo de rotação mecânica por 4 minutos. Durante este tempo, as partículas de colesterol revestidas com cardioplipina e lecitina irão flocular caso a amostra contenha reaginas, sendo a floculação visível ao microscópio, ou permanecerão livres em suspensão no caso da amostra não conter reaginas.

c- Reagentes

- **Antígeno VDRL-BRÁS:** Antígeno constituído por uma mistura de cardioplipina, lecitina e colesterol, dissolvidos em etanol absoluto. O antígeno é estável até a data indicada em rótulo, desde que conservado em **temperatura ambiente**, protegido da umidade e isento de contaminantes;
- **Salina tamponada:** Mistura aquosa de fosfato de sódio, fosfato de potássio, cloreto de sódio e azida sódica (0,01%).

d- Armazenamento e estabilidade

O produto deve ser mantido em temperatura ambiente, em um local seco e fresco, condições nas quais se mantém estável até a data de validade expressa em rótulo, desde que isento de contaminações. A ampola de antígeno após aberta, deve ter seu conteúdo transferido para o frasco que acompanha o conjunto, e este mantido sempre bem fechado.

e- Precauções e cuidados especiais

- Os reagentes **não podem ser refrigerados ou congelados**; uma vez que os componentes do conjunto sejam refrigerados, deixam de se prestar ao uso, devendo ser descartados;
- Manter os frascos sempre fechados para evitar ressecamento dos reagentes;
- Os reagentes destinam-se ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo portanto ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
Caso o tampão ou o antígeno apresentem-se turvos ou precipitados, devem ser descartados;
- O antígeno não pode entrar em contato com quaisquer materiais de borracha;

- Deve-se evitar o uso de materiais que possam causar contaminação dos reagentes, tais como ponteiros plásticos de micropipetadores automáticos.

6. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Agitador mecânico tipo Kline ajustável a 180 rpm que circunscreva um círculo de 19 mm de diâmetro num plano horizontal;
- Micropipeta ou dispositivo para dispensar 0,05 mL (50 µL);
- Lâminas de vidro planas com 12 delimitações de 14mm de diâmetro cada (cód. LB 550116);
- Placas de Kline (escavadas) **apenas para teste com LCR**;
- Seringa de vidro de 1 ou 2 mL com agulha 18G sem bixel (para soro) ou 22G sem bixel (para LCR);
- Frasco de vidro com fundo chato, rolha de vidro esmerilhada, 30 mL de capacidade e fundo chato com cerca de 35 mm de diâmetro (cód. LB 550108);
- Banho-maria com temperatura 56 °C.

7. PROCEDIMENTO TÉCNICO

7.1 Teste de exatidão da agulha

- Adaptar a agulha 18G ou 21G sem bixel à seringa e preencher esta com 1 ou 2 mL suspensão antigênica;
- Dispensar com a seringa na posição vertical exatamente 1 mL contando o número de gotas que deverá ser de 60 (entre 58-62 gotas) para garantir 0,017 mL/gota para agulha 18G, ou 100 (98-102) gotas para agulha 21G, o que garante 0,01 mL por gota.

7.2 Preparo da suspensão antigênica

a- A temperatura no local de análise deve estar entre 23-29 °C e os reagentes igualmente a esta temperatura;
b- Pipetar 0,4 mL de salina tamponada para o frasco com fundo chato;
c- O antígeno (0,5 mL) é adicionado gota-a-gota numa velocidade de 6 segundos para cada 0,5 mL. A velocidade de rotação apropriada é obtida quando o centro do frasco circunscreve um círculo de 5 cm de diâmetro, aproximadamente 3 vezes por segundo;
d- Manter a agitação por mais 10 segundos, e adicionar 4,1 mL de salina tamponada;
e- Fechar o frasco e agitar aproximadamente 30 vezes em 10 segundos, estando então a suspensão pronta para o uso;
Observações
- A suspensão após preparada é estável por apenas 2h na temperatura ambiente ou 8 horas em geladeira (2-8 °C);
- A suspensão não pode ser congelada nem entrar em contato com borracha (esta danifica as partículas e prejudica a reatividade);
- Avaliar a suspensão após preparada frente a soros não reagente, fracamente reagente e reagente.

7.3 Procedimento para soro

- Teste Qualitativo

a- Verificar a temperatura ambiente. Esta deve estar entre 23-29 °C, abaixo do que a reatividade decresce e acima do que a reatividade aumenta;
b- Usando uma micropipeta ou dispositivo apropriado, transferir uma gota (0,05 mL) de amostra para o centro de um círculo da lâmina de vidro; proceder igual para os controles;
c- Homogeneizar a suspensão antigênica cuidadosamente e com suavidade, adicionando uma gota de 0,017 mL (usar seringa com agulha 18G sem bixel) a cada círculo contendo amostra e controles, homogeneizando a seguir;
d- Colocar a lâmina em um agitador mecânico (Kline ou similar) e agitar durante 4 **minutos** a 180 ± 2 rpm (em clima seco manter em câmara úmida durante o processo para prevenir contra o ressecamento do material);
e- Ler os resultados dentro de 1 minuto ao microscópio em aumento de 100x (ocular e objetivas de 10x):

- As amostras **reagentes** apresentam aglomerados de antígeno visíveis ao microscópio;- As amostras **não reagentes** apresentam uma mistura homogênea de amostra e antígeno;
- O fenômeno de prozona é ocasionalmente observado. Este tipo de reação, é demonstrado quando uma completa ou parcial inibição da reatividade ocorre com o soro não diluído e uma reatividade máxima é obtida somente com o soro diluído. Este fenômeno pode ser relatado como resultado fracamente reagente ou "aspereza" não reagente em um teste qualitativo que poderá ser fortemente reagente quando diluído. Portanto, recomenda-se que, todos os soros que fornecerem resultados fracamente reagentes ou "aspereza" não reagente no teste qualitativo, sejam automaticamente retestados utilizando-se o processo quantitativo.

- Teste Quantitativo

a- Verificar a temperatura ambiente, esta deve estar entre 23-29 °C, abaixo da qual a reatividade decresce e acima da qual a reatividade aumenta;
b- Colocar 0,05 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) estéril nos círculos de 2 a 6 da lâmina de vidro;
c- Usando dispensador adequado, colocar 0,05 mL de amostra no círculo 1 e no círculo 2;
d- Misturar o soro e a solução fisiológica no círculo 2 por aspiração 8 vezes;
e- Transferir 0,05mL do círculo 2 para o círculo 3 e misturar, em seguida transferir igual quantidade do círculo 3 para o círculo 4 e assim por diante até o círculo 6, desprezando os últimos 0,05 mL; obtém-se as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 respectivamente para os círculos 2, 3, 4, 5 e 6;
f- A partir deste ponto, proceder como o indicado no teste qualitativo;

g- O título é considerado a mais alta diluição que apresenta reatividade (exemplo: se a amostra é reativa até 1/16 este será o título); caso a última diluição ainda se apresente reagente, continuar a diluição seriada (1:64, 1:128 etc.).

7.4 Procedimento para LCR

Preparar a suspensão antigênica adicionando uma parte de salina a 10% a uma parte da suspensão antigênica de VDRL BRÁS (esta mistura é estável ,por apenas 2h) e homogeneizar suavemente por inversão ou rotação durante 5 minutos (não mais de 2 horas);

- proceder ao teste como indicado para o soro **usando uma gota de suspensão de 0,01 mL** (agulha 21 ou 22G), e, caso a amostra seja reagente, determinar seu título .

- Precauções e cuidados especiais (para soro e LCR)

- Homogeneizar a suspensão antigênica antes do uso;
- Uma causa de erro freqüente é o uso da suspensão após 8h de seu preparo , seu congelamento ou sua conservação na temperatura ambiente além do recomendado;
- Não há nenhuma correlação entre a qualidade da floculação e o título da amostra;
- Leituras tardias podem apresentar resultados falsos (após um minuto da agitação, as lâminas devem ser novamente colocadas no agitador pelo menos por um minuto);
- Ressecamento da suspensão antigênica em climas quentes pode causar resultados falso positivos;
- Velocidade e tempo de agitação diferentes ao preconizado alteram a reatividade;
- Relação amostra/suspensão antigênica diferente da preconizada altera a reatividade;
- Suspensão antigênica danificada pela passagem forçada pela agulha ou que tenha tido contato com borracha ocasiona decréscimo da reatividade;
- O tempo de homogeneização da mistura amostra-antígeno de 4 minutos tem de ser observado rigorosamente, sob risco do resultado não corresponder à realidade.

8. RESULTADOS

Evitar liberar resultados usando a terminologia “positivo”, “negativo” ou ainda expressar o mesmo em cruzes.

- Positivos

Reportar como “Amostra analisada reagente até o título ... (Indicar o título)”;

- Negativos

Reportar como “Amostra analisada não reagente”.

Espera-se que a amostra apresente-se não reagente.

Interpretações

- A prova do VDRL BRÁS reagente indica infecção passada ou presente por um treponema, erro laboratorial ou interferência por outras patologias;
- Amostras VDRL BRÁS não reagentes e não reagentes ao FTA-ABS indicam inexistência de infecção sífilítica presente ou passada;
- Amostras VDRL BRÁS reagentes e FTA-ABS não reagentes indicam cicatriz

sorológica (infecção passada tratada) ou reação inespecífica (como ocorre com o soro de algumas gestantes);

- Amostras VDRL BRÁS não reagentes não descartam a hipótese de doença em incubação;
- Aumentos de 4 vezes no título de VDRL BRÁS indicam progressão da doença, e diminuições de 4 vezes no título, indicam regressão (êxito na terapia).

9. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- A Laborclin baseou-se nas normas do CDC (Centers of Disease Control) para elaboração do produto e instruções de uso, devendo portanto o usuário seguir rigorosamente todas as instruções apresentadas para garantir uma reatividade padrão;
- Comparando-se os títulos de VDRL com os preparados prontos para uso (RPR), espera-se uma diferença de até um título entre as técnicas;
- Todas as amostras reagentes ao VDRL BRÁS devem ser confirmadas por uma prova treponêmica (como FTA-ABS);
- Uma amostra não reagente ao VDRL BRÁS não exclui a probabilidade de doença;
- Indivíduos com histórico passado de sífilis podem apresentar títulos de reatividade baixos (“cicatriz” sorológica) mesmo anos após tratados.

- Interferentes

Dentre os muitos interferentes, listamos abaixo os principais:

- Amostras hemolisadas ou contaminadas;

Recomenda-se a leitura dos textos de Tietz e Young para maiores informações.

10. CONTROLE DE QUALIDADE

- Materiais necessários

Amostras clínicas com título conhecido .

- Periodicidade

Recomenda-se que a cada preparação da suspensão antigênica sejam avaliadas uma amostra não reagente, uma amostra fracamente reagente e uma amostra reagente. A cada bateria de testes deve-se avaliar amostras de controle.

- Interpretação e avaliação

Espera-se que os controles não reagentes não apresentem floculação, e que os controles reagentes apresentem floculação. Quaisquer resultados diferentes dos esperados devem ter suas causas apuradas, e neste período, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados.

11. GARANTIA DE QUALIDADE

A Laborclin obedece o disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário :

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso , manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser solicitados junto ao SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente, bem como em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, através do telefone 0800-410027. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Harris, A.; Rosenberg, A.A., Riedel, L.M. A microflotation test for syphilis using cardiolipin antigen: preliminary report. J. Ven. Dis. Inform.; 27:169-74, 1946.
- 2- Harris, A.; Rosenberg, A.A.; Del Vecchio, E.R. The VDRL slide flocculation test for syphilis: II. A supplementary report. J. Ven. Dis. Inform.; 29:72-5, 1948.
- 3- Duncan, W.P.; Bossack, H.N.; Harris A. VDRL slide spinal fluid test. Am. J. Clin. Pathol.; 35:93-5, 1961.
- 4- Brown, S.T.; Zaidi, A.; Larsen, S.A.; Reynolds, G.H. Serological response to syphilis treatment. A new analysis of old data. JAMA; 253:1296-9, 1985.
- 5- Larsen, S.A. et al. A manual of tests for syphilis. American Pub. Health Assosiation, 92-8, 1990.
- 6- Larsen, S.A.; Hambie, E.A.; Wobig, G.H.; Kennedy, E.J. Cerebrospinal fluid serologic test for syphilis: Treponemal and nontreponemal tests in: Morisset, R.; Kurstak, E. Eds. Advances in Sexually transmitted diseases. The Netherlands: VNW Science Press, 157-62, 1986.
- 7 - Robins, S.L. et al: Patologia estrutural e funcional, 4ª ed., G. Koogan, 1991.