



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos



Manual de Treinamento para TR DPP® Sífilis

Ensaio qualitativo para detecção de anticorpos
específicos para *treponema pallidum* em
amostras de sangue total, soro e plasma

www.bio.fiocruz.br

Índice

1. Considerações Técnicas.....	3
2. Apresentação e Componentes do ensaio.....	6
3. Procedimento para realização do TR DPP® Sífilis - Bio-Manguinhos.....	8
4. Leitura e Interpretação dos resultados.....	11
4.1 Interpretação visual dos resultados.....	12
A. Resultado não reagente.....	12
B. Resultado reagente.....	12
C. Resultado inválido.....	13
4.2 Utilização da escala visual para interpretação dos resultados.....	13
5. Conservação e estocagem do material.....	15
6. Considerações Finais.....	15
7. Referências Bibliográficas.....	16
8. Contatos do SAC.....	17

1. Considerações Técnicas

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível causada por uma espiroqueta da espécie *Treponema pallidum*. É uma infecção bacteriana crônica que permanece como uma questão de saúde pública em todo o mundo. A sífilis pode ser transmitida via sexual e da mãe infectada para o bebê durante a gestação.

Anualmente, 3 milhões de mulheres dão à luz no Brasil, considerando-se uma taxa de transmissão de 25%, de acordo com a estimativa da OMS, e prevalência de sífilis em 1,6% das mulheres, estima-se que aproximadamente 49 mil gestantes e 12 mil nascidos vivos estão infectados.

A sífilis durante a gravidez pode causar aborto e natimorto, além de cegueira, surdez, deficiência mental e malformações no feto.

A incidência de sífilis em parturientes é quatro vezes maior que a da infecção pelo HIV. É considerada infectada toda gestante que durante o pré-natal, no momento do parto ou curetagem apresente evidência clínica de sífilis e/ou sorologia não treponêmica reagente, com teste treponêmico positivo ou não realizado.

A sífilis também é conhecida como lues (palavra latina que significa praga), cancro duro, avariose, doença-do-mundo, mal-de-franga, mal-de-nápoles, mal-de-santa-eufêmia e pudendagra, entre outros.

Os primeiros sintomas da doença são pequenas feridas nos órgãos sexuais (cancro duro) e caroços nas virilhas (ínguas), que surgem entre 7 e 20 dias após o sexo desprotegido com alguém infectado. A ferida e as ínguas não doem, não coçam, não ardem e não apresentam pus. Mesmo sem tratamento, essas feridas irão desaparecer sem deixar cicatriz, porém a doença continua a se desenvolver.

O diagnóstico bem como o tratamento apropriado e antecipado previnem a transmissão e desenvolvimento de complicações severas. Um teste sorológico rápido pode aumentar consideravelmente os esforços da saúde pública em diminuir a disseminação desta infecção. A detecção sorológica de anticorpos específicos para *T. pallidum* é importante para o diagnóstico da sífilis. Vários testes sorológicos estão disponíveis atualmente como o VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), teste da reagina plasmática rápido (RPR), teste de absorção com anticorpo treponêmico fluorescente (FTA-ABS), testes de hemoaglutinação para *T. pallidum* (TPHA), ensaio imunoenzimático treponêmico EIA, aglutinação de partículas de *Treponema pallidum* (TPPA) e Western blot (WB).

O TR DPP® Sífilis é um teste rápido imunocromatográfico treponêmico simples e de fácil uso. O TR DPP® Sífilis, é um teste qualitativo para a detecção de anticorpos específicos para *Treponema pallidum* em soro, plasma ou sangue total.

O TR DPP® Sífilis –Bio-Manguinhos utiliza uma combinação de antígenos recombinantes de *T.pallidum* ligados a uma membrana (fase sólida) e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal. A amostra é aplicada ao tampão de eluição, seguida pela adição desta solução ao poço 1.

O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da solução (tampão de eluição + amostra) ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar o tampão de corrida ao poço 2.

O conjugado se liga ao complexo antígeno-anticorpo na área TESTE (T) produzindo uma linha (roxa/rosa) nesta área. Na ausência de anticorpo para sífilis a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T).

A eficiência do ensaio é controlada para garantir a segurança do teste. Um reagente controle imobilizado na membrana do suporte determinará o surgimento de uma linha, cuja presença demonstrará que os reagentes estão funcionando corretamente (área controle C).

2. Apresentações e componentes do ensaio

Material Fornecido:

TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos – para 10 ou 20 determinações:

- Suportes DPP® Sífilis com antígenos Treponêmico embalados individualmente 10 ou 20 unidades
- Tampão de corrida - 01 frasco com 3 mL ou 6 mL
- Alças coletoras descartáveis (10µL) -10 ou 20 unidades
- Frasco para eluição - 10 ou 20 frascos com 1 mL
- Lancetas estéreis descartáveis -10 ou 20 unidades
- Curativo Adesivo – 10 ou 20 unidades
- Manual de Instruções de Uso

Material Complementar não fornecido:

- Cronômetro ou relógio
- Luvas descartáveis e jaleco para proteção individual
- Algodão
- Álcool 70%
- Água sanitária ou solução de hipoclorito de sódio a 2,5%
- Recipiente para descarte de material biológico e perfuro-cortante



Figura 1 – TR DPP® SÍFILIS

IMPORTANTE

Recomenda-se utilizar o kit somente até a data de validade do kit, que é considerada aquela descrita na embalagem.
Não usar os insumos de lotes de kits diferentes.
Recomenda-se estocagem do kit de 2º a 30º C.

3. Procedimento para realização do TR® DPP Sífilis – Bio-Manguinhos

- Certifique-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente (15 a 30°C) antes de ser utilizada.
- Retirar o número necessário de componentes do kit TR DPP® Sífilis - Bio-Manguinhos necessários à execução do ensaio e colocá-los sobre uma superfície plana. Certifique-se de que os componentes do kit estejam à temperatura ambiente no momento do uso (15 a 30°C).
- Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o número de registro do paciente ou número de identificação da amostra, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.

IMPORTANTE **CRITÉRIO DE REJEIÇÃO DO ENSAIO**

O teste TR DPP® Sífilis tem 2 linhas coloridas na janela de teste, 1 azul (linha teste) e 1 verde (linha controle) (figura 2). Se uma ou as 2 linhas coloridas estiverem ausentes, não utilize o teste. Desconsidere o suporte de ensaio e guarde o mesmo para análise técnica do problema pelo controle de qualidade". Comunique o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos (Avenida Brasil, 4365 - Manguinhos. Cep: 21040-900 – RJ/RJ. Tel: (21) 3882-7101 – Fax: (21) 3882-7176 SAC: 08000.210.310 ou sac@bio.fiocruz.br). Utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

Poço 2 =
TAMPÃO



Janelas de Teste com
Linhas Azuis e Verde

Poço 1 = AMOSTRA + TAMPÃO

Figura 2

- Antes de coletar a amostra de sangue, soro ou plasma, identificar o frasco para eluição com o nome do indivíduo ou número de identificação e desenrosque o dosador (parte branca) do frasco mantendo a tampa azul rosqueada no dosador.



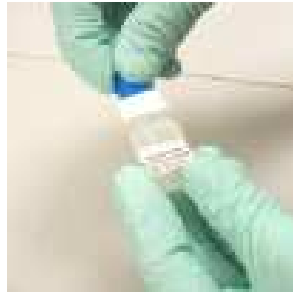
- Encostar a alça coletora de 10 µL na amostra a ser testada permitindo que a alça seja preenchida com a amostra.
OBS: Em caso de coleta de sangue da ponta do dedo, utilizar as lancetas (inclusas no kit), de acordo com as instruções de uso que as acompanham.



- Inserir a alça coletora de 10 µL com a amostra no frasco de eluição identificado de modo que toque no fundo do frasco. Dobre a haste da alça coletora no ponto de quebra a fim de que a extremidade com a amostra permaneça dentro do frasco de eluição.



- Recolocar o dosador no frasco de eluição certificando de que tanto o dosador quanto a tampa azul estão bem fechados e agite levemente 10 segundos.



- Retirar somente a tampa azul do dosador e girar o frasco de eluição mantendo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço 1. Adicionar duas gotas da solução, lentamente, ao poço 1.



- Aguardar cinco minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.



- Verter o frasco de tampão de corrida e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço 2. Adicionar quatro gotas de tampão, lentamente, ao poço 2.



- Deixar o teste correr por 10 minutos após a adição do tampão ao poço 2 a temperatura ambiente . Caso não haja migração após 3 minutos da adição do tampão no poço 2, descartar o teste.

IMPORTANTE

Não ler os resultados após 25 minutos contados a partir da adição do tampão de corrida ao poço 2.

ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico e perfuro-cortante.

4. Leitura e interpretação dos resultados

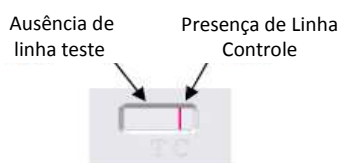
Os resultados serão interpretados visualmente.

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e anotar no protocolo de trabalho em anexo.

4.1 Interpretação visual dos resultados

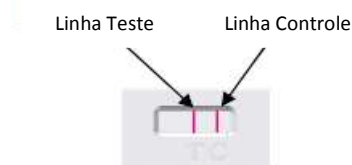
a. Resultado não reagente

Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para antígenos treponêmicos na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por Sífilis.



b. Resultado reagente

A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indicam um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para antígenos treponêmicos foram detectados.

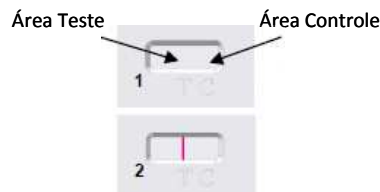


ATENÇÃO

A finalização do diagnóstico da sífilis deve seguir as recomendações do Ministério da Saúde.

c. Resultado inválido

Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido e este resultado não pode ser interpretado. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.



Limitações de procedimento

Resultados falso-negativos podem ser obtidos caso o teste seja utilizado em amostras de pacientes conhecidamente positivos, que estejam recebendo tratamento antibacteriano.

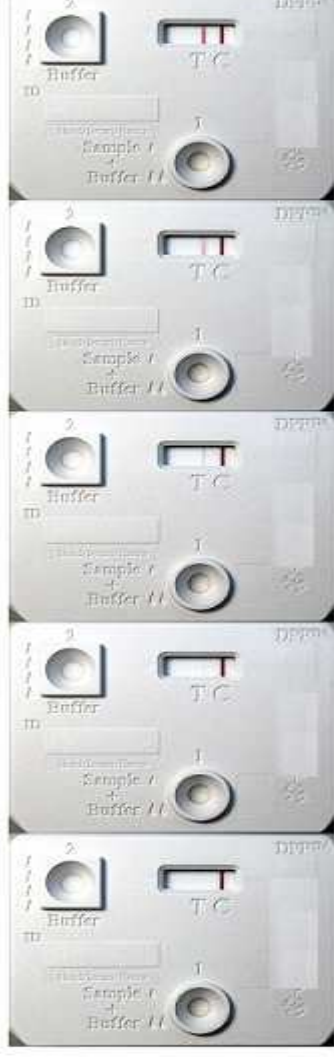
4.2 Utilização da escala visual para interpretação dos resultados

A finalidade deste procedimento é fornecer orientações para a leitura visual e avaliação dos resultados dos testes DPP, utilizando-se a escala de avaliação.

Procedimento:

1. Antes de ler os resultados, certifique-se que a Escala de Avaliação esteja localizada próxima ao teste, para comparação;
2. Os resultados não reagentes serão lidos e registrados como negativo (Neg);
3. Os resultados positivos serão lidos e registrados como positivo (Pos) ou positivo fraco (Pf);
4. Os resultados devem ser registrados de forma adequada em cadernos ou formulários, de acordo com os procedimentos do laboratório

Não Reagente Reagente



Escala de Avaliação

5. Conservação e estocagem do material

O kit TR DPP® Sífilis - Bio-Manguinhos devem ser armazenados entre 2 e 30°C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30°C. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original.

IMPORTANTE

Não congele o kit ou seus componentes!

6. Considerações finais

- O kit TR DPP® Sífilis - Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual e/ou manual que acompanha o kit, visando à obtenção de resultados adequados.
- Somente abra o envelope laminado contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.
- Não utilize kits ou componentes com a data de validade vencida.
- Um resultado não-reagente não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por Sífilis, dado que uma resposta imunológica à exposição recente pode levar algumas semanas para atingir níveis detectáveis.
- Um resultado positivo utilizando o TR DPP® Sífilis indica a presença de anticorpos para antígenos treponêmicos na amostra. O objetivo deste teste é auxiliar o diagnóstico da Sífilis.

7. Referências bibliográficas

1. World Health Organization. (2001) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates. Geneva: WHO.
2. Sandra, A. L., Bret, M. S., and Andrew, H. R. (1995) Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin. Microbial. Rev.* 8(1):1-21.
3. Pope, V., M. B. Fears, W. E. Morrill, A. Castro, and S. E. Kikkert. (2000) Comparison of the Serodia Treponema pallidum particle agglutination, captia Syphilis-G, and SpiroTeck Reagin II tests with standard test techniques for diagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2543 - 2545.
4. Castro, R., E. S. Prieto, I. Santo, J. Azevedo, and F. da L. exposto. (2003) Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against treponema pallidum. *J. Clin. Microbiol.* 41: 250 - 253.
5. Sambri, V., A. Marangoni, C. Eyer, C. Reichhuber, E. Soutschek, M. Negosanti, A. D'Antuono, and R. Cevenini. (2001) Western immunoblotting with five Treponema pallidum recombinant antigens for serological diagnosis of syphilis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:534 - 539.
6. Centers for Disease Control (CDC). (2005) Updated U.S. Public Health service guidelines for the management of occupational exposure to HIV and Recommendations for postexposure Prophylaxis. *MMWR.* 54(RR09): 1-17.
7. Manual de Instruções de Uso do Kit TR DPP® Sífilis - Bio-Manguinhos

8. Em caso de solicitações ou notificações



Entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos
(Avenida Brasil, 4365 - Manguinhos. Cep: 21040-900 – RJ/RJ.
Tel: (21) 3882-7101 – Fax: (21) 3882-7176
SAC: 08000.210.310 ou sac@bio.fiocruz.br .

