

## **Divulgado pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade**

### **Diretrizes da OMS para Procedimentos Operacionais em Microbiologia: Pesquisa de Sífilis**

A Sífilis é causada por um treponema denominado *Treponema pallidum*. A doença se manifesta em estádios primário, secundário e terciário. O estágio primário é caracterizado pela formação de uma úlcera (denominada cancro) na genitália. O diagnóstico pode ser feito por:

- 1. Demonstração direta do *T. pallidum***
- 2. Prova serológica.**

No estágio primário, os espiroquetas são abundantes na lesão, enquanto que o anticorpo pode estar totalmente ausente.

O diagnóstico serológico é fundamental nos estádios secundário e terciário.

#### **> Demonstração direta**

A detecção de treponemas no interior do material da lesão é peça chave no diagnóstico. O método recomendado é a microscopia em campo escuro.

#### **> Coleta do espécime**

Faça a coleta do espécime antes de iniciar a terapia com antibiótico.

Se houver múltiplas lesões presentes, escolha a mais recente e acessível.

Limpe a superfície da lesão com solução salina e seque-a por absorção.

Cuidadosamente, remova as cascas das lesões se elas já se tiverem formado.

Esfregue superficialmente a lesão até o sangue brotar. Isto é necessário para se obter um exsudato claro oriundo da superfície da lesão.

Aplique leve pressão na base da lesão e remova as primeiras gotas de sangue.

Com uma lâmina de vidro de microscópio, toque o exsudato claro, cubra o espécime com uma lamínula e

imediatamente examine a lâmina no microscópio em campo escuro.

O exsudato também pode ser removido por meio de uma pipeta capilar e em seguida transferido para uma lâmina

de vidro. Alternativamente, o material da lesão pode ser aspirado com uma agulha calibre 26, inserida na base da lesão após injetar uma gota de solução salina no local.

#### **> Armazenamento e transporte**

Os treponemas são muito suscetíveis a influências ambientais e são rapidamente inativados por calor, frio, dessecação e pela maioria dos desinfetantes. Devido à sua natureza delicada, é importante examinar imediatamente o material obtido na lesão. Não é recomendável armazenar em temperatura ambiente ou refrigerada ainda que por algumas horas.

As amostras de soro são armazenadas a 4º ou -20º C. Algumas gotas de amostra de sangue coletadas por punção digital em papel de filtro podem ser transportadas em segurança até o laboratório. O soluto obtido desse material pode ser usado para a realização de testes.

#### **> Exame por microscópio com campo escuro**

Deve estar disponível um microscópio equipado com uma boa fonte de iluminação e condensador para campo escuro.

Coloque algumas gotas de óleo de imersão no condensador do microscópio de campo escuro.

Abaixe ligeiramente o condensador, para que o óleo fique abaixo do nível da plataforma.

Posicione a lâmina no microscópio e levante o condensador até haver bom contato entre o óleo e a superfície inferior da lâmina. Cuidadosamente, evite aprisionar bolhas de ar no óleo.

Usando a objetiva de baixa resolução (10x), coloque o espécime em foco. Centralize a iluminação do campo por meio dos parafusos de centralização localizados no condensador e focalize o condensador, para baixo ou para cima, até obter o menor diâmetro de luz.

Use a objetiva seca de 40x, coloque o espécime em foco, e examine a lâmina cuidadosamente. Evite luz do dia brilhante.

#### **> Observações**

O *T. pallidum*, iluminado contra fundo escuro, aparece branco. Ele é identificado pela morfologia típica, tamanho e movimentos. É um organismo delgado, com 8-14 espirais regulares, juntas e espessas. Seus movimentos são rápidos e repentinos. Ele gira relativamente devagar em torno de um eixo longitudinal, como um saca-rolhas. A rotação é seguida de uma torção no meio, executada um tanto rigidamente. Também podem ser observados alongamentos e contrações, como um elástico que se estende e contrai.

A demonstração do *T. pallidum* diagnostica a sífilis primária e secundária.

#### **> Precauções**

A não-ocorrência de observação do organismo no microscópio de campo escuro não elimina a possibilidade de sífilis. Resultados negativos podem ocorrer quando os pacientes estão sob tratamento antimicrobiano, ou quando um número insuficiente de microorganismos estiver presente nas lesões, ou quando a lesão estiver próxima a uma

cicatrização.

Sempre que os resultados forem negativos na microscopia de campo escuro, deve ser coletada uma amostra de sangue para testes sorológicos.

Considerando que o diagnóstico está baseado na motilidade do organismo, podem ser obtidos resultados errôneos quando os espécimes testados forem velhos.

#### > **Relatório de resultados**

A presença de organismos semelhantes ao *Treponema pallidum* em esfregaços sobre campo escuro constitui diagnóstico positivo de sífilis primária.

A ausência de organismos semelhantes ao *Treponema pallidum* não elimina a possibilidade de sífilis.

#### > **Testes de sensibilidade**

O *Treponema pallidum* continua sensível a penicilina/eritromicina. Não há necessidade de testes de sensibilidade.

#### > **Evidência sorológica**

##### > **Teste VDRL**

Este é um teste de floculação realizado em lâmina que detecta anticorpos não-treponêmicos (reagina) no soro. Com pequenas modificações, ele também pode ser realizado em fluido cérebrospinal.

##### > **VDRL no soro**

Inative o soro límpido a 56°C por 30 minutos, imediatamente antes da realização do teste. Quando tiver decorrido mais do que quatro horas após esse aquecimento, o soro a ser testado deve ser reaquecido a 56°C por 10 minutos.

##### > **Antígeno**

Pode ser obtido no comércio. Consiste numa solução alcoólica de 0,03% de cardiopina, 0,9% de colesterol e lecitina purificada suficiente para produzir a reatividade padrão. Uma solução salina tamponada é fornecida juntamente com o produto comercializado para a produção da suspensão do antígeno. Caso a solução salina não vier com o antígeno, deve ser preparada no laboratório.

#### > **Procedimento**

##### > **Preparo da suspensão**

Pipete 0,4 ml da solução salina tamponada para um frasco de vidro de 30 ml ou um frasco com tampa de rosca.

Adicione 0,5 ml de antígeno diretamente à solução salina no prazo de 6 segundos, girando o frasco gentil e continuamente sobre uma superfície plana.

Sobre a última gota de antígeno restante na pipeta sem tocar na solução salina.

Continue girando o frasco durante 10 segundos pelo menos.

Adicione 4,1 ml de solução salina tamponada.

Coloque a tampa no frasco e agite vigorosamente durante cerca de 10 segundos, guardando-o em local escuro.

A solução de antígeno preparada dessa maneira deve ser utilizada no prazo de um dia e somente após decorrida meia-hora do preparo.

##### > **Cuidando da agulha para gotejamento do antígeno**

O número de partículas de antígeno por campo microscópico é determinado pelo tamanho da gota da suspensão de antígeno. Por isso, a limpeza da agulha a ser utilizada deve ser realizada todos os dias.

Utilize uma agulha calibre 18 ou 19, com a ponta cortada (sem o bisel), ou calibre 23 com a ponta em bisel, colocada em seringa de 1 ml, para assegurar a obtenção de 60 gotas da suspensão de antígeno.

Segure a seringa mantendo a ponta da agulha ou do bisel para baixo e a superfície de gotejamento na horizontal.

Caso a agulha tenha a ponta cortada, a seringa deve ser mantida na vertical.

##### > **Inspecionando a suspensão de antígeno**

Todas as preparações de suspensão de antígeno devem ser previamente examinadas por meio de testes com controles de soro conhecidos, positivos e negativos. As partículas de antígeno têm a aparência de bastões curtos numa resolução de 100x. A agregação dessas partículas em grandes ou pequenos grumos pode ser interpretada como sinais de positividade.

#### > **Procedimento**

##### > **Teste qualitativo de soro em lâmina**

Pipete 0,5 ml de cada soro aquecido num poço em lâminas de vidro, ou placa de VDRL.

Prepare um soro de controle testado previamente para dar reações em diversos graus, para controle e orientação da leitura.

Adicione uma gota (0,016 ml) de suspensão de antígeno em cada um.

Agite a placa em círculos por 4 minutos. A rotação pode ser feita num agitador de VDRL ou manualmente. Se o movimento for manual, deve fazer um círculo com cerca de 5 cm de diâmetro 120 vezes por minuto.

Leia cuidadosamente o teste após a rotação e faça o registro.

##### > **Registrando resultados**

Nenhum ou poucos grumos – Não-reativo

Pequenos grumos – Fracamente reativo

Grupos médios e grandes - Reativo

Registre os resultados do teste de qualidade somente como reativo (R), fracamente reativo (FR) ou não-reativo (NR).

#### > Teste quantitativo por lâmina

##### > Diluições do soro

Pipete 0,5 ml de solução salina fisiológica recém preparada em cada um de cinco ou mais tubos de ensaio.

Adicione 0,5 ml de soro aquecido ao tubo nº 1, misture bem e transfira 0,5 ml para o tubo nº 2.

Continue misturando e transferindo até o último tubo conter 1 ml. Descarte 0,5 ml deste tubo. Resultarão diluições de 1:2, 1:4, 1:8 e assim por diante.

Teste cada diluição do soro conforme descrito no teste qualitativo do soro.

##### > Lendo e registrando

Leia o teste pelo microscópio em 10x, conforme descrito no procedimento para teste qualitativo e registre a titulação como a recíproca da diluição seriada que produz uma reação reativa [resultado reagente]. Registre a titulação como reagente e acrescente a titulação, ex. = VDRL reagente, diluição 1:16.

##### > VDRL em Líquor

Nos testes do fluido cefalorraquidiano por anticorpos reagina, o antígeno é sensibilizado primeiramente pela mistura, e rotação suave, com igual quantidade de solução de cloreto de sódio a 10%; a agulha é escolhida de tal modo que 1 ml proporcione 100 gotas, e depois de misturar com 0,05 ml de amostras de líquido, as lâminas ou placas são giradas durante 8 minutos. O laudo é semelhante à de amostras de soro.

Atualmente o teste rápido de reagina plasmática (RPR) é largamente recomendado para uso em estudos de campo. O teste pode ser realizado em soro ou plasma não aquecido e lido a olho nu. Os reagentes estão disponíveis no comércio e possuem preços acessíveis.

- o Falsos positivos biológicos em VDRL
- o Lupus eritematoso sistêmico
- o Malária
- o Lepra lepromatosa
- o Mononucleose infecciosa
- o Eosinofilia tropical
- o Febre recorrente
- o Hepatite
- o Artrite reumatóide
- o Colagenose
- o Trauma severo
- o Doenças da artéria coronariana
- o Perda repetida de sangue
- o Menstruação
- o Vacinação
- o Gravidez
- o Anemia hemolítica
- o Dependência de heroína
- o Regeneração de tecido
- o Infecção respiratória superior
- o Determinados medicamentos anti-hipertensivos

##### > Garantia de qualidade em testes de VDRL

Utilize soros reativos e não reativos tanto para testes qualitativos como quantitativos a fim de validar os resultados. Utilize medidas de controle interno da qualidade que deve abranger a totalidade dos aspectos do diagnóstico. O microscopista encarregado dos relatórios sobre a presença do *T. pallidum* em microscopia de campo escuro deve ser treinado.

##### > Referências

1. Para eliminar resultados de VDRL Falsos Positivos Biológicos, a amostra pode ser enviada a um laboratório de referência para testes específicos.
2. Para programa de garantia da qualidade.

##### > Biosegurança

As lesões por treponema freqüentemente exsudam material infeccioso. Por este motivo, o examinador deve usar luvas.

Desinfete lâminas e instrumentos utilizados na obtenção de esfregaços para microscopia de campo escuro. Etanol a 70% é eficaz para isso.

Lave as mãos com água e sabão após manusear o espécime.

Utilize dispositivos de segurança na pipetagem de soro para os testes VDRL.

Antes de realizar o exame do material clínico, o domínio das técnicas pode ser alcançado fazendo uso de treponemas não-patogênicos colhidos nas margens gengivais de pessoas saudáveis.

##### > Literatura suplementar

1. Larsen SA, Siener BM, Rudolph A.H.: Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin. Microbiol. Rev. 8: 1-21, 1995.
2. Hart G: Syphilis tests in diagnostic and therapeutic decision making. Ann. Intern Med. 104, 368-376, 1986.
3. Miller, J.N.: Value and limitations of non-treponemal and treponemal tests in the laboratory diagnosis of syphilis. Clin. Obstet. Gynaecol. 19: 191-203,1975.

*Fonte: Blood Safety and Clinical Technology. Guidelines on Standard Operating Procedures for MICROBIOLOGY - Chapter 16.*