

Hanalydia de Melo Machado

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONVERSÃO DO PLASMA SOBRE A  
REATIVIDADE E ESTABILIDADE DE PAINÉIS SOROLÓGICOS PARA  
DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS**

**FLORIANÓPOLIS**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Hanalydia de Melo Machado

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONVERSÃO DO PLASMA SOBRE A  
REATIVIDADE E ESTABILIDADE DE PAINÉIS SOROLÓGICOS PARA  
DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS**

Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau de Licenciado em  
Ciências Biológicas  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Bazzo

**FLORIANÓPOLIS**

**2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Hanalydia de Melo

Avaliação dos efeitos da conversão do plasma sobre a reatividade e estabilidade de painéis sorológicos para diagnóstico da sífilis / Hanalydia de Melo Machado ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, 2017.

70 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Sífilis. 3. Controle de Qualidade. 4. Diagnóstico. 5. Sorologia. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENADORIA DOS CURSOS DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Campus Universitário - Trindade - CEP: 88040-900 - Florianópolis - SC  
Telefone: (48) 3721-9235 - e-mail: biologia@contato.ufsc.br  
Site: www.cienciasbiologicas.ufsc.br

**BIO7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II**

**ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Semestre 2017 / 1

Aluno: Haralydia de Melo Machado  
Número de matrícula: 13106531  
Título do Trabalho: Avaliação dos efeitos da conversão do plasma sobre reatividade e estabilidade de painéis serológicos para diagnóstico de Sífilis  
Orientador(a): Maria Luiza Bazzo  
Co-Orientador(a): \_\_\_\_\_  
Local de apresentação do trabalho: Sala de aula da Técnica Operatória - HU/UFSC

**Avaliação pela banca examinadora**

Presidente:	<u>Maria Luiza Bazzo</u>	Nota:	<u>10</u>
Membro Titular:	<u>Carlos Roberto Louren</u>	Nota:	<u>10</u>
Membro Titular:	<u>Flávia Martinello</u>	Nota:	<u>10</u>
Membro Suplente:	<u>Letícia Munhoz Willmer</u>	Nota:	<u>10</u>
Média Final:	<u>10 (Dez)</u>		

A Banca examinadora solicitou as seguintes alterações no TCC: algumas sugestões de alterações e/ou conexões foram cutucadas diretamente a aluna e sua orientadora para considerações

Maria Luiza Bazzo  
Presidente da Banca

[Assinatura]  
Membro Titular

[Assinatura]  
Membro Titular

Letícia Munhoz Willmer  
Membro Suplente

Florianópolis, 20 de Junho de 2017.

*“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana. Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais... Os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento”.*

*(Charles Darwin)*



## AGRADECIMENTO

Já se passaram cinco anos desde o início dessa trajetória acadêmica... Gostaria de agradecer a todos os professores, que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Agradeço ao meu companheiro há quase sete anos, Martin, que sempre me apoiou e nunca me deixou desistir, que esteve presente nos melhores e piores momentos... que construiu comigo muitos dos meus princípios, que hoje é meu colega de curso e dialoga comigo durante longos períodos sobre a biologia, sobre a evolução, bioquímica e ecologia... Que me ajudou a refletir sobre várias convicções... E que me ouviu muitas vezes repetindo resultados de testes.

À minha orientadora Professora Maria Luiza Bazzo, agradeço imensamente pela oportunidade de realizar esse trabalho no laboratório, como funcionária e hoje também como aluna; agradeço por todos os momentos de discussão e orientação que contribuíram muito para minha formação profissional e para a concretização desse estudo.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, que em todas as oportunidades solucionaram minhas dúvidas e tiveram paciência para me ensinar todas as metodologias que hoje eu sei. Agradeço muitíssimo ao Alisson e à Renata, que me ajudaram desde o momento de colocar o projeto no papel, nos experimentos e na escrita do trabalho; Thaís, Jéssica, Tai, Manu... *Muchas gracias chicas* por toda a disposição nos longos dias de testagem...

Aos colegas e funcionários do setor de Análises Clínicas do HU, sempre dispostos a ajudar e ensinar os alunos; aos bioquímicos Sandro e Neto, do setor de Imunologia, que tiveram paciência e disposição para auxiliar nos dias de testagem e em todos os outros nos quais eu chegava no setor com várias perguntas...

Aos meus familiares, Anna Luiza, Rosi, Sérgio, Luiz, Lidia e João, que com muito carinho sempre apoiaram e incentivaram a continuidade dos meus estudos, amo vocês; Geneci, Oscar, Vanessa, Karine e Thiago, amo vocês, obrigada por tudo. Aos meus filhinhos, Shiva e Luna, que estavam sempre ao meu lado ou no meu colo durante os estudos;

Agradeço ao Ministério da Saúde, que cedeu os 1000 dispositivos de teste rápido para sífilis utilizados nesse trabalho.



## RESUMO

Os casos de sífilis vêm aumentando no mundo, no Brasil e em Santa Catarina. A OMS estima que 937 mil pessoas são infectadas a cada ano no país. Em Santa Catarina foram registrados 5.427 novos casos de sífilis em 2015, um aumento de quase 50% comparado com o total notificado em 2014. O diagnóstico da sífilis é baseado nas manifestações clínicas, pesquisa direta do patógeno e testes sorológicos. Para que os testes realizados no diagnóstico da sífilis possuam confiabilidade no seu resultado, é necessário que os laboratórios e os serviços que realizam o diagnóstico participem de programas de controle de qualidade. A unidade de saúde ou laboratório deve garantir que no processo analítico os resultados atendam aos critérios de qualidade exigidos por lei. O presente trabalho pretende avaliar os efeitos da conversão do plasma em soro e a adição de azida de sódio como conservante. A desfibrinação transforma o plasma, de bolsas de doadores, em soro, por meio da recuperação da cascata de coagulação com trombina e cálcio. Além disso, o trabalho pretende verificar possíveis alterações na reatividade das amostras submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento e ciclos de congelamento e descongelamento durante 90 dias. Foram utilizadas duas bolsas reagentes para sífilis e uma bolsa não reagente. Após o tratamento das bolsas, as amostras foram separadas em 4 grupos (G): G1: Plasma sem azida de sódio, G2: Soro sem de azida de sódio, G3: Plasma com azida de sódio, G4: Soro com azida de sódio. Foram distribuídas alíquotas desses quatro grupos em cinco condições de armazenamento: 2 a 8°C, 30°C, -20°C (duas alíquotas) e -80°C. Uma das alíquotas armazenadas em -20°C foi descongelada em banho-maria (37°C) por 30 minutos e a outra foi descongelada em temperatura ambiente de laboratório (20 a 26°C). A partir do armazenamento das alíquotas em cada condição, foram realizados 12 ciclos de testagem, um a cada sete dias, totalizando 12 semanas. As amostras foram avaliadas com um teste rápido treponêmico (Bioeasy) e um teste não-treponêmico (RPR Wama), a fim de comparar os tratamentos realizados nas bolsas de plasma e os efeitos das diferentes condições às quais as amostras foram expostas, por meio da comparação dos resultados da reatividade dessas alíquotas nos respectivos testes. Esse estudo demonstrou que apesar do tempo de armazenamento e constante manipulação das alíquotas, os resultados obtidos na bolsa 1 (reagente) não demonstram diferença entre a reatividade inicial e final nos testes realizados. Já os resultados relacionados à bolsa 2 (reagente) tiveram diferenças nos testes não-treponêmicos e principalmente nas alíquotas armazenadas na temperatura de 30°C, que também sofreram alterações no teste treponêmico, porém, as alíquotas dessa bolsa armazenadas em -20°C não sofreram alterações em sua reatividade.

**Palavras-chave:** Sífilis. Diagnóstico. Soro. Plasma. Controle de qualidade.



## ABSTRACT

Syphilis cases have been increasing in the world, in Brazil and in Santa Catarina. WHO estimates that 937 thousand people are infected each year in the country. In Santa Catarina, 5.427 new cases of syphilis were registered in 2015, an increase of almost 50% compared to the number of cases reported in 2014. The diagnosis of syphilis is based on clinical manifestations, direct pathogen research and serological tests. In order for the tests performed in the diagnosis of syphilis to have reliability in their results, the laboratories and services that perform the diagnosis must participate in quality control programs. The health unit or laboratory must ensure that in the analytical process the results meet the quality criteria required by law. The present work intends to evaluate the effects of the conversion of plasma to serum and the addition of sodium azide as a preservative. Defibrination transforms plasma, from donor bags, into serum by means of recovery the plasma coagulation cascade with thrombin and calcium. In addition, the work intends to verify possible changes in the reactivity of samples submitted to different storage temperatures and freezing and thawing cycles for 90 days. Two different syphilis reagent bags and one non-reagent bag were used. After treatment of this bags, the samples were separated into 4 groups (G): G1: Plasma without sodium azide, G2: Serum without sodium azide, G3: Plasma with sodium azide, G4: Serum with sodium azide. Aliquots of these four groups were distributed under five storage conditions: 2-8°C, 30°C, -20°C (two aliquots) and -80°C. One of the aliquots stored at -20°C was thawed in a warm bath (37 °C) for 30 minutes. The remainder was thawed at laboratory room temperature (20 to 26 °C). From the storage of the aliquots in each condition, 12 cycles of testing were performed, one every seven days, totaling 12 weeks. The samples were evaluated with a rapid treponemal test (Bioeasy) and a non-treponemal test (RPR Wama), in order to compare the treatments performed in the plasma bag and the effects of the different conditions to which samples were exposed, by means of the comparison of the reactivity results of these rates in the respective tests. This study demonstrated that despite storage time and constant manipulation of aliquots, the results obtained in bag 1 (reagent) did not show any difference between initial and final reactivity in the tests performed. However, the results related to bag 2 (reagent) had differences in the non-treponemal tests, mainly in the aliquots stored at 30°C, which also underwent alterations in the treponemal test, but the aliquots of this bag stored at -20°C did not change this reactivity.

**Keywords:** Syphilis. Diagnosis. Serum. Plasma. Quality control.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do antígeno na forma de micela utilizado nos testes não-treponêmicos.....	16
Figura 2 - Alíquotas das bolsas.....	22
Figura 3 - Alíquota após adição da solução de trombina e cálcio .....	23
Figura 4 - Amostras em agitador orbital após adição de kaolin .....	23
Figura 5 - Amostra de plasma desfibrinado após centrifugação .....	24
Figura 6 - Sedimento resultante da centrifugação .....	24
Figura 7 - Comparativo Bolsa 1 .....	25
Figura 8 - Resultado de VDRL visualizado em microscópio óptico.....	26
Figura 9 - Visualização do resultado 1:8 em teste de RPR .....	27
Figura 10 - Exemplo da distribuição das alíquotas nas cinco caixas de armazenamento em cada temperatura.....	30
Figura 11 - Microscopia de fluorescência.....	31
Figura 12 - Dispositivos do Teste Rápido Alere Sífilis com resultado reagente.....	32
Figura 13 - Parâmetros utilizados para avaliar a intensidade da linha teste (T).....	33
Figura 14 - Ilustração da reação de quimiluminescência.....	34
Figura 15 - Reatividade das alíquotas de todos os grupos no teste FTA-ABS .....	36
Figura 16 - Reatividade das amostras da Bolsa 1 no Teste Rápido.....	37
Figura 17 - Reatividade das amostras da Bolsa 2 no Teste Rápido.....	38
Figura 18 - Reatividade das amostras da Bolsa Não Reagente no Teste Rápido .....	38
Figura 20 - Presença de fungos nas amostras de soro decorrente das condições de armazenamento .....	51
Figura 21 - Presença de coágulo na amostra de plasma.....	51



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantitativo das alíquotas.....	29
Tabela 2 - Testes realizados por ciclo .....	29
Tabela 3 - Quantitativo de testes utilizados para análise das amostras durante os 90 dias do estudo .....	34
Tabela 4 - Resultados obtidos na caracterização .....	35
Tabela 5 - Resultados obtidos na recharacterização .....	36
Tabela 6 - Resultados qualitativos obtidos na Quimiluminescência para Sífilis.....	39
Tabela 7 - Resultados iniciais e finais dos títulos do RPR por grupo e temperatura.....	51



## ABREVIACÕES

<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida do inglês <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CMIA</b>	Imunoensaio quimiluminescente por partículas magnéticas do inglês <i>Chemiluminescent Magnetic Immunoassay</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico do inglês <i>Desoxiribonucleic acid</i>
<b>DPP</b>	Plataforma de duplo percurso do inglês <i>Dual Path Platform</i>
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático do inglês <i>Enzyme Linked Immunoassays</i>
<b>FTA-Abs</b>	Teste de absorção de anticorpos treponêmico fluorescente do inglês <i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorption</i>
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
<b>IFI</b>	Imunofluorescência indireta
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IST</b>	Infecção sexualmente transmissível
<b>LBMMS</b>	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
<b>LCR</b>	Líquor
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NR</b>	Não Reagente
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCA</b>	Plasma com azida de sódio
<b>POC</b>	do inglês <i>Point of Care</i>
<b>PSA</b>	Plasma sem azida de sódio
<b>R</b>	Reagente
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RN</b>	Recém-Nascido
<b>RPR</b>	Reagina rápida de plasma do inglês <i>Rapid Plasma Reagin</i>
<b>SCA</b>	Soro com azida de sódio

<b>SSA</b>	Soro sem azida de sódio
<b>SUS</b>	Sistema único de saúde
<b>TP-PA</b>	Ensaio de aglutinação de partículas do <i>T. pallidum</i> do inglês <i>Treponema pallidum passive particle agglutination</i>
<b>TR</b>	Teste Rápido
<b>VDRL</b>	do inglês <i>Veneral disease research laboratory</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....	21
3.1 METODOLOGIA .....	21
<b>3.1.1 Amostragem</b> .....	21
<b>3.1.2 Desfibrinação e Conservação</b> .....	21
<b>3.1.3 Recaracterização</b> .....	25
<b>3.1.4 Armazenamento</b> .....	27
<b>3.1.5 Testes</b> .....	30
<b>3.1.6 Quantitativo de testes</b> .....	34
<b>4 RESULTADOS</b> .....	35
4.1 RESULTADOS OBTIDOS NA RECARACTERIZAÇÃO.....	35
4.2 RESULTADOS OBTIDOS ENTRE O 1º E 12º DIA DE TESTAGEM .....	36
<b>4.2.1 FTA-Abs</b> .....	36
<b>4.2.2 Teste Rápido</b> .....	37
<b>4.2.3 Quimiluminescência</b> .....	38
<b>4.2.4 RPR</b> .....	40
4.3 ALTERAÇÕES DAS ALÍQUOTAS .....	51
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61



## 1 INTRODUÇÃO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria *Treponema pallidum* subs. *pallidum*, do gênero *Treponema*, família *Treponemataceae*, conhecida por ser uma doença infecciosa crônica e sistêmica, exclusiva da espécie humana, relatada desde o século XV, e que apesar de ter tratamento eficiente e de baixo custo, se mantém como problema de saúde pública (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). A transmissão ocorre pela via sexual (sífilis adquirida) e vertical da mãe para o feto (sífilis congênita). Embora menos frequente, outras formas de transmissão são conhecidas, como por exemplo transfusão de sangue (BRASIL, 2010). Devido à complexidade da doença, é necessário que se conheça o histórico do paciente para que se faça um diagnóstico correto (FERGUSON; VARNADO, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 12 milhões de novos casos de sífilis a cada ano, e mais de 90% desses casos ocorram em países em desenvolvimento (KAUR; KAUR, 2015).

Os casos de sífilis vêm aumentando no mundo, no Brasil e em Santa Catarina. A OMS estima que 937 mil pessoas são infectadas a cada ano no país. Em Santa Catarina, entre os anos de 2010 e 2015, 15.797 pessoas foram diagnosticadas com sífilis adquirida. Foram registrados 5.706 novos casos de sífilis adquirida apenas no período de 2015 ao início de 2016. Além desses, foram notificados 3.339 novos casos em gestantes no período de 2015 e início de 2016. Os casos de sífilis congênita também tiveram incremento, em 2010 haviam sido notificados 76 casos, entre 2014 e 2015 a sífilis congênita apresentou crescimento de 75%, com 475 novos casos notificados comparados aos 272 em 2014. Nesse sentido, foram notificados 1.248 casos em crianças menores de um ano no período de 2010 a 2015, resultando em 58 óbitos em decorrência da sífilis (SANTA CATARINA, 2016).

A evolução da sífilis é lenta, e quando não tratada, alterna períodos sintomáticos e assintomáticos, com características clínicas distintas, que são divididas nas fases: sífilis primária, sífilis latente, sífilis secundária e sífilis terciária (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

Após a infecção, ocorre um período de incubação que varia entre 10 e 90 dias, na sífilis primária. O contato com as lesões contagiantes pelos órgãos genitais é responsável por 95% dos casos de sífilis. O primeiro sintoma é o aparecimento de uma lesão, geralmente única, no local de entrada do treponema, e pode cursar junto com enfartamento de linfonodos regionais. A lesão, caracterizada por ser indolor, tem a base endurecida, contém secreção serosa com muitos treponemas, é chamada de cancro duro. Essa lesão se cura

espontaneamente, em aproximadamente duas semanas (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). Quando a sífilis deixa de ser tratada na fase primária, evolui para sífilis secundária, e a partir desse estágio, o treponema já invadiu todos os órgãos e líquidos do corpo. Nesta fase, aparece como manifestação clínica a linfadenopatia generalizada e o exantema cutâneo, com muitos treponemas, frequentemente em regiões úmidas do corpo, em palmas das mãos e plantas dos pés. As lesões nessa fase, normalmente, curam-se espontaneamente entre duas e seis semanas. Na ausência de tratamento após a sífilis secundária, existem dois períodos de latência: um recente, com menos de um ano, no qual a doença é assintomática, mas ainda é considerada infecciosa, e outro de latência tardia, com mais de um ano, no qual as lesões estão ausentes, e nesse caso, a doença não é considerada infecciosa. As manifestações do estágio tardio de sífilis ocorrem em aproximadamente um terço dos casos não tratados, evoluindo para sífilis terciária, um terço das pessoas irão progredir para cura espontânea e um terço irão continuar no estado de latência ao longo da vida. Existem três formas comuns de manifestações de sífilis tardia: goma sífilítica, sífilis cardiovascular e neurosífilis. Na maioria dos casos, os sintomas do estágio tardio ocorrem entre 10 e 20 anos após a infecção inicial (LARSEN et al., 1998). A neurosífilis pode ocorrer em qualquer estágio, contudo, durante os primeiros estágios, as regiões mais comumente afetadas são as meninges, nervos craniais e olhos (NYATSANZA; TIPPLE, 2016).

O resultado da disseminação do *Treponema pallidum*, da gestante infectada não tratada ou tratada inadequadamente<sup>1</sup>, para o seu conceito, por via placentária, caracteriza a sífilis congênita. Sabe-se que a transmissão vertical de *T. pallidum* pode ocorrer em qualquer fase gestacional e os principais fatores que determinam a probabilidade de transmissão vertical da bactéria são: o estágio da sífilis na mãe e o tempo de exposição do feto no útero, além de existir a possibilidade de transmissão direta de *T. pallidum* por meio do contato da criança pelo canal de parto, quando houver lesões genitais maternas. A taxa de infecção da transmissão vertical de *T. pallidum* em mulheres não tratadas é de 70% a 100%, nas fases primária e secundária da doença, reduzindo para aproximadamente 30% nas fases tardias da infecção materna (latente tardia e terciária) (BRASIL, 2010).

---

<sup>1</sup> Na impossibilidade de realizar a dessensibilização durante a gestação, a gestante deverá ser tratada com ceftriaxona 1 g, IV ou IM, 1 vez ao dia, por 8 a 10 dias; entretanto, essa gestante não será considerada adequadamente tratada para fins de transmissão fetal, sendo obrigatória a investigação e o tratamento adequado da criança logo após seu nascimento. Brasil, Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis e hepatites virais, 2015.

No Brasil, existem políticas de vigilância relacionadas à sífilis congênita, que é uma doença de notificação compulsória, com compromisso internacional de eliminação enquanto problema de saúde pública (BRASIL, 2005).

O diagnóstico da sífilis é baseado nas manifestações clínicas, pesquisa direta do agente infeccioso e em testes sorológicos. No caso da sífilis primária o diagnóstico é direto, e a partir da terceira ou quarta semana após o aparecimento do cancro podem ser realizados testes sorológicos, pois os anticorpos já são passíveis de detecção (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). A microscopia de campo escuro e testes para detectar *T. pallidum* diretamente na lesão do tecido são métodos definitivos para diagnosticar sífilis primária. Apesar de não existirem testes de detecção de *T. pallidum* comercialmente disponíveis, alguns laboratórios desenvolveram e validaram testes moleculares para a detecção do DNA de *T. pallidum* (UNITED STATES OF AMERICA, 2015).

O diagnóstico sorológico requer a detecção de dois tipos de anticorpos distintos, anticorpos não-treponêmicos (IgG e IgM) contra lipídeos que estão presentes no soro do hospedeiro, os quais foram produzidos devido ao dano à membrana de suas mitocôndrias e contra os lipídeos de membrana de *Treponema pallidum*; e anticorpos treponêmicos produzidos contra determinantes antigênicos de *T. pallidum* (ROTTA, 2005).

Os testes não-treponêmicos (NT) como o RPR (do inglês *Rapid plasma reagin*), USR (do inglês *Unheated serum reagin*) e TRUST (do inglês *Toluidine red unheated serum test*) e VDRL (do inglês *Veneral disease research laboratory*), baseiam-se na detecção dos anticorpos não-treponêmicos que se ligam à cardiolipina (determinante antigênico) presente nas micelas da suspensão antigênica (Figura 1), composta por uma solução alcoólica contendo cardiolipina, colesterol e lecitina. As várias ligações dos anticorpos à cardiolipina das micelas, resulta em uma floculação, que é visualizada em microscópio óptico no caso do VDRL e USR, mas que nos outros testes não-treponêmicos citados pode ser visualizada a olho nu, devido à presença de carvão na suspensão antigênica no RPR e do corante vermelho de toluidina no TRUST (BRASIL, 2015).

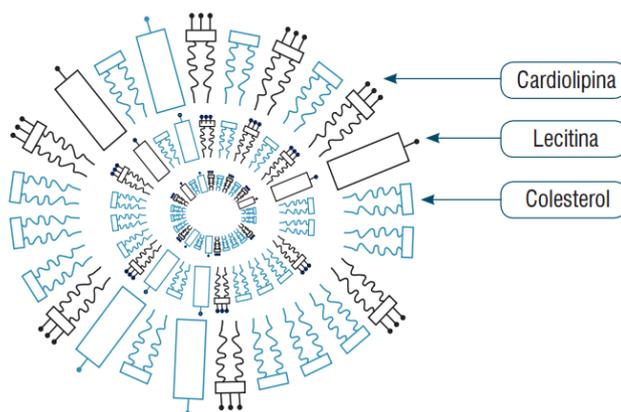
Os testes não-treponêmicos são utilizados para triagem da sífilis, onde a amostra é utilizada pura e diluída 1:8, a fim de evitar resultados falso-negativos devido ao fenômeno prozona<sup>2</sup>. Amostras reagentes na triagem devem ser tituladas para acompanhamento da doença. Esses testes são utilizados para o monitoramento da resposta ao tratamento e seu

---

<sup>2</sup> O fenômeno de prozona decorre da relação desproporcional entre as quantidades de antígenos e anticorpos presentes na reação não-treponêmica, podendo gerar resultados falso-negativos. Ocorre nas amostras puras de pessoas com sífilis, em virtude da elevada quantidade de anticorpos. Brasil, Ministério da Saúde. Manual técnico para diagnóstico de Sífilis, 2016.

sucesso é indicado pela queda do título. Pessoas que apresentam títulos baixos em testes não-treponêmicos, não possuem registro de tratamento e sem data de infecção conhecida, considera-se como portadoras de sífilis latente tardia. Caso a infecção seja detectada nas fases tardias da doença, títulos baixos podem se manter por meses ou anos, sendo necessário o conhecimento do histórico do paciente (BRASIL, 2015).

**Figura 1 - Representação do antígeno na forma de micela utilizado nos testes não-treponêmicos**



Fonte: BRASIL, 2015.

As metodologias empregadas nos testes para a detecção dos anticorpos treponêmicos são: imunofluorescência indireta (FTA-Abs, do inglês *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*), hemaglutinação e aglutinação passiva (TP-PA/TPHA, do inglês *T. pallidum passive particle agglutination* e *T. pallidum haemagglutination test*), quimiluminescência (CMIA, do inglês *Chemiluminescent Magnetic Immunoassay*), imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), *Western blot* e testes imunocromatográficos (testes rápidos (TR) ou *Point of care (POC)*), os quais são usados como testes confirmatórios, quando adotado o fluxograma 1 (teste inicial não-treponêmico confirmado por teste treponêmico) indicado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de sífilis para serviços que dispõem de infraestrutura laboratorial com capacidade de liberação rápida dos resultados (BRASIL, 2010).

Embora pouco realizada em laboratórios brasileiros, a pesquisa direta de *T. pallidum* é desejável e deveria ser mais frequente no diagnóstico da sífilis. Na pesquisa direta por microscopia de campo escuro – a pesquisa do *T. pallidum* em material coletado de lesão cutaneomucosa, por exemplo, é um procedimento que apresenta sensibilidade de 70% a 80%. A observação em campo escuro permite visualizar os treponemas móveis. Nos casos em que a

observação do material não pode ser realizada logo após a coleta, a imunofluorescência direta é indicada (BRASIL, 2005).

A sensibilidade dos testes não-treponêmicos (VDRL e RPR) na fase primária é de 78%, na secundária 100% e na latente cerca de 96%. A partir do início do tratamento, o título do teste não-treponêmico diminui progressivamente, podendo ser reagente por longos períodos com baixos títulos (1:1; 1:2), mesmo após a cura da infecção, o que configura a cicatriz sorológica. Ressalta-se, entretanto, que nos casos de sífilis não tratada (latente) também são encontrados baixos títulos de anticorpos não-treponêmicos, fato que demonstra que nem sempre baixos títulos são sinônimos de cicatriz sorológica (BRASIL, 2005).

O teste rápido (TR) é um teste treponêmico utilizado no diagnóstico da sífilis, nos quais a execução, leitura e interpretação do resultado ocorrem em até 30 minutos, sem a necessidade de estrutura laboratorial, o que permite um amplo acesso do teste a lugares sem a estrutura demandada pelos demais testes sorológicos. O teste rápido, geralmente, utiliza a metodologia de imunocromatografia de fluxo lateral ou de imunocromatografia em plataforma de duplo percurso – DPP do inglês Dual Path Platform (BRASIL, 2015).

Recém-nascidos (RN) de mães com sífilis, mesmo os não infectados, podem apresentar anticorpos IgG treponêmicos e não-treponêmicos maternos transferidos passivamente pela placenta. Nesses casos, em geral, o teste normalmente é reagente. A coleta de sangue periférico do RN é necessária caso a mãe apresente resultado reagente no momento do parto. A sorologia treponêmica composta por FTA-Abs e ELISA que detectam IgM são testes úteis para confirmação do diagnóstico em RN, porém sua sensibilidade é baixa (<50%), dessa forma, quando utilizados, deve-se ter em mente que um resultado negativo não exclui o diagnóstico de sífilis congênita, sendo recomendado que seja feita a análise clínica e epidemiológica do caso (BRASIL, 2016). A partir dos 18 meses, um resultado reagente no teste treponêmico confirma a infecção. Recomenda-se realizar a análise do líquido (LCR) em todos os RN que se enquadrem na definição de caso de sífilis congênita. A presença de leucocitose e o elevado conteúdo proteico no LCR de um RN, suspeito de ser portador de sífilis congênita, devem ser considerados para o diagnóstico como evidências adicionais. Uma criança com VDRL positivo no LCR deve ser diagnosticada como portadora de neurosífilis, independentemente de alterações na celularidade ou presença de proteínas, no entanto, um resultado negativo não define a ausência da doença do sistema nervoso central. Outra metodologia utilizada é o Raio X, pois o achado de anormalidades em radiografias de ossos longos é comum na sífilis congênita sintomática em cerca de 70% a 90% (BRASIL, 2005).

Para que todos os testes realizados no diagnóstico da sífilis possuam confiabilidade no seu resultado, é necessário que os laboratórios e as redes que realizam o diagnóstico participem de programas de controle da qualidade, dessa forma, a unidade de saúde ou laboratório deve garantir que no processo analítico os resultados produzidos atendam um nível de qualidade desejado. No processo de diagnóstico, o exame laboratorial tem a finalidade de confirmar, complementar ou excluir um diagnóstico clínico. Os testes integram importante etapa do processo, do diagnóstico e do monitoramento do tratamento (OLIVEIRA; MENDES, 2011).

Segundo Ribeiro (2006), a necessidade de sistemas que garantam a qualidade de serviços relacionados à saúde, como laboratórios, é uma grande preocupação do setor terapêutico, portanto, é indispensável que seja feita uma análise da qualidade desses serviços, além de garantir a segurança do diagnóstico correto.

Em um laboratório de análises clínicas, é necessária a adesão aos programas de qualidade e boas práticas laboratoriais. A garantia da qualidade pode ser alcançada quando se obtém absoluto controle sobre todas as etapas do processo, que compreende (1) a fase pré-analítica, que inclui a obtenção da amostra para realização do diagnóstico, (2) analítica, correspondente ao processamento da amostra, e (3) pós-analítica, conferência e liberação do resultado (CONTROL LAB, 2011).

A RDC 302/05 da ANVISA dispõe que os laboratórios de análises clínicas devem participar de programas de controle da qualidade interno e externo. O controle da qualidade interno deve monitorar o registro dos resultados obtidos e análise de dados, além de ser realizada uma definição de critérios de aceitação dos resultados por tipo de analito e de acordo com a metodologia utilizada. Já no controle da qualidade externo, o laboratório deve participar de ensaios de proficiência para todos os exames realizados. A Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) é uma avaliação interlaboratorial, por meio de testes de proficiência, cuja adesão é voluntária, sendo garantida a imparcialidade, a independência e a confidencialidade quanto à identificação dos participantes, seus procedimentos e resultados. As amostras provenientes desses ensaios devem ser analisadas como se fossem amostras de rotina. Os participantes, por sua vez, recebem relatórios de desempenho individuais e globais e podem avaliar sua própria prática (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005).

O material utilizado no controle externo da qualidade deve permitir comparações interlaboratoriais, e pode ser derivado totalmente ou parcialmente de fontes humanas (SANDLE, 2005).

Os painéis sorológicos são uma forma de realizar a avaliação externa da qualidade dos laboratórios ou serviços que realizam testes sorológicos para o diagnóstico de sífilis. Para a produção desses painéis, o material ideal a ser utilizado é o soro, porém, quando não disponível, deve ser realizada a desfibrinação do plasma de bolsas de sífilis rejeitadas pelos serviços de hemoterapia. Essa metodologia é sugerida, pois o plasma é menos estável e possui problemas relacionados à coagulação, especialmente depois de congelar e descongelar (WHO, 1996).

Os desafios encontrados para produzir painéis de controle da qualidade começam com a obtenção de bolsa de plasma, devido a triagem primária nos serviços de hemoterapia, que exclui possíveis portadores de IST's e outras doenças. Outro fator importante é o material utilizado na sorologia para sífilis, na qual muitos fabricantes de testes recomendam apenas a utilização do soro, descartando a utilização do plasma, portanto, os produtores de painéis sorológicos precisam adequar as amostras e transformar o plasma em soro para atender as especificidades dos testes, além de otimizar a utilização do plasma, visto que o número de bolsas de plasma descartadas tende a ser baixo.

O Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) possui uma parceria com o Departamento de IST, AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde, na qual o LBMMS é produtor de painéis de avaliação externa da qualidade de testes rápidos. A partir dessa parceria, foram pensados os objetivos desse estudo. Dessa forma, para garantir a qualidade e eficiência dos painéis, é necessário conhecer as variações que as amostras de plasma e soro podem sofrer no laboratório, o quanto elas são resistentes a ciclos de descongelamento e congelamento, além das temperaturas e condições ótimas para seu armazenamento e validade.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Analisar o comportamento de amostras de plasma reativas para sífilis armazenadas em diferentes condições de temperatura após desfibrinação e adição de azida de sódio.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar os efeitos do congelamento e descongelamento do soro (resultante da desfibrinação do plasma) sobre os títulos em testes não-treponêmicos e manutenção da reatividade em testes treponêmicos;
- Analisar os efeitos do descongelamento abrupto em banho-maria 37°C sobre o título do plasma e do soro nos testes não-treponêmicos e sobre a manutenção da reatividade em testes treponêmicos;
- Testar a reatividade das amostras de plasma e de soro resultante da desfibrinação do plasma após a adição de azida de sódio;
- Verificar a possível precipitação de cristais nas amostras de soro resultante da desfibrinação do plasma;
- Verificar os efeitos da estocagem em diferentes condições de temperatura e manipulação das amostras em período de até 90 dias.

### **3 DESENVOLVIMENTO**

#### **3.1 METODOLOGIA**

##### **3.1.1 Amostragem**

No presente trabalho foram utilizadas três bolsas de plasma congelado de doadores, duas com sorologia reagente para sífilis e uma com sorologia não reagente para os seguintes marcadores: HIV I/II, Hepatites B e C, Doença de Chagas, Sífilis, HTLV I/II, Malária e Citomegalovírus. Essas bolsas foram rejeitadas pelo HEMOSC e doadas para o Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) da UFSC. As três bolsas de plasma continham o anticoagulante e conservante CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina). A utilização das amostras está de acordo com os princípios éticos e o estudo foi aprovado pelo CEPESH/UFSC parecer 1.850.547 (CAAE: 57429016.0.0000.0121).

##### **3.1.2 Caracterização**

As três bolsas escolhidas foram caracterizadas para identificação dos títulos das bolsas e reatividade com as metodologias de quimiluminescência, teste rápido, FTA-Abs, RPR e VDRL.

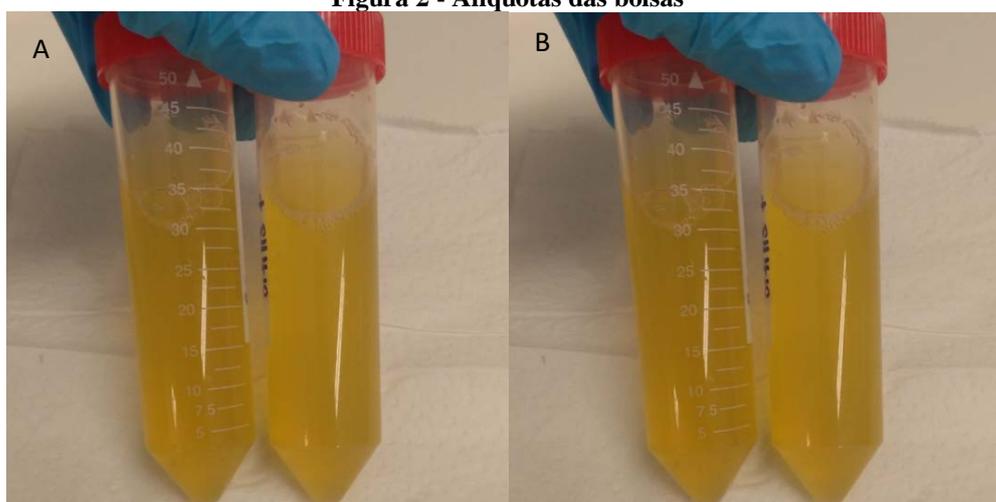
##### **3.1.3 Desfibrinação e Conservação**

A desfibrinação consiste em transformar o plasma das bolsas de doadores em soro, por meio do tratamento das amostras com trombina e cálcio. Essas bolsas foram caracterizadas para definição da reatividade em testes treponêmicos e do título do anticorpo em testes não-treponêmicos. As duas bolsas reagentes escolhidas possuem títulos de anticorpo não-treponêmico distintos.

O processo de desfibrinação foi realizado de acordo com a metodologia de Castro e colaboradores (2002), com modificações: duas alíquotas de 40 ml de cada bolsa de plasma reagente para sífilis foram separadas em dois tubos do tipo Falcon® (BD®) de 50 ml (Figura 2-A; B). Essas alíquotas foram incubadas em banho maria 37°C por 30 minutos. A cada alíquota foram adicionados 400 µl de solução de Trombina de plasma humano (Sigma Aldrich®) na concentração de 100 U/ml em 1M de cloreto de cálcio. Após homogeneização,

as alíquotas foram incubadas por mais 10 minutos e depois deixadas a temperatura ambiente (20-26°C) por uma hora para a formação do coágulo (Figura 3). Depois da formação do coágulo, as amostras foram congeladas a temperatura de - 20°C por 4 horas. Após esse processo, as alíquotas foram descongeladas a temperatura ambiente e submetidas novamente ao congelamento (-20°C) por quatro horas. Após o segundo descongelamento, cada alíquota recebeu a adição de quatro gramas de Kaolin (Sigma®) (agente purificante), previamente hidratado com água destilada e secado em estufa de 37°C. Depois, a suspensão foi misturada continuamente por quatro horas a temperatura ambiente, utilizando-se uma mesa agitadora (Figura 4). As amostras foram incubadas novamente, a temperatura de 2-8°C *overnight*, em constante agitação de aproximadamente 27 movimentos por minuto, em um agitador do tipo “basculante”. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas em 1955 x g por 45 minutos, e em seguida, uma segunda centrifugação na rotação 7197 x g por 10 minutos (Figura 5). Após a retirada do sobrenadante, o plasma tratado foi filtrado em uma membrana de poro 0.22mm. Na Figura 6 é possível observar o sedimento composto do resíduo de Kaolin e do coágulo retirado da amostra de plasma. O mesmo procedimento foi realizado com a bolsa não reagente para sífilis, mas utilizando-se uma alíquota de 25 ml. Após esse processo, uma alíquota de cada bolsa (40 ml) foi tratada com azida de sódio 1M para concentração final de 0,1%. Na Figura 7 é possível observar a diferença entre o aspecto das amostras antes da desfibrinação (turva) e depois da desfibrinação (translúcida).

**Figura 2 - Alíquotas das bolsas**



Legenda: A: Alíquotas da Bolsa 1, B: Alíquotas da Bolsa 2.

Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 3 - Alíquota após adição da solução de trombina e cálcio**



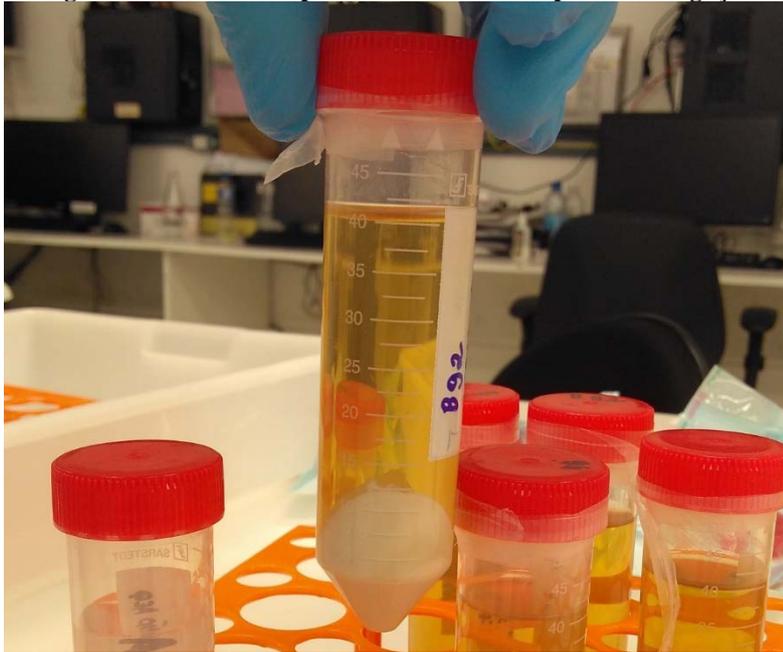
Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 4 - Amostras em agitador orbital após adição de kaolin**



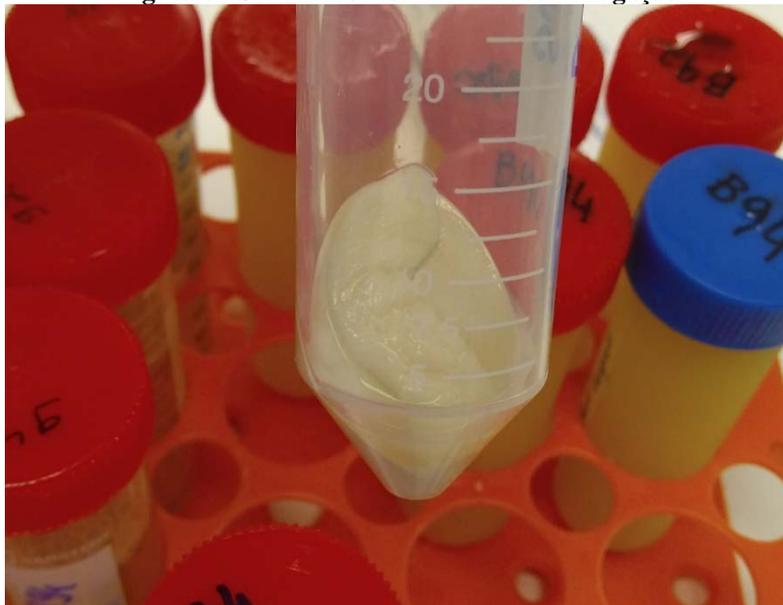
Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 5 - Amostra de plasma desfibrinado após centrifugação**



Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 6 - Sedimento resultante da centrifugação**



Legenda: Sedimento composto de coágulo e Kaolin. Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 7 - Comparativo Bolsa 1**



Legenda: Alíquotas da bolsa 1. Amostra antes (turva) e depois da desfibrinação (translúcida). Fonte: Acervo pessoal, 2017.

### 3.1.4 Recaracterização

#### 3.1.4.1 VDRL

Para o teste VDRL o antígeno foi preparado momentos antes da testagem. Foram utilizadas lâminas de vidro planas, demarcadas com 12 círculos com 14 mm de diâmetro cada (lâminas de VDRL).

Para preparar o antígeno do teste VDRL ASI™ Antigen Test foi necessário:

- Adicionar 0,4 ml da salina (do kit) em um Erlenmeyer com tampa;
- Pipetar 0,5 ml do antígeno de forma gradual, com rotação contínua. Esse deve ser adicionado gota a gota em aproximadamente 6 segundos;
- Realizar rotação no Erlenmeyer durante 10 segundos;
- Adicionar 4,1 ml de salina;
- Fechar o Erlenmeyer e agitar por inversão 30 vezes em 10 segundos.

Após a preparação do antígeno, sua qualidade foi verificada com a testagem de uma amostra reagente com título conhecido (VDRL quantitativo) e de uma amostra não reagente.

A confirmação da qualidade da suspensão antigênica permitiu a testagem das amostras de soro e plasma.

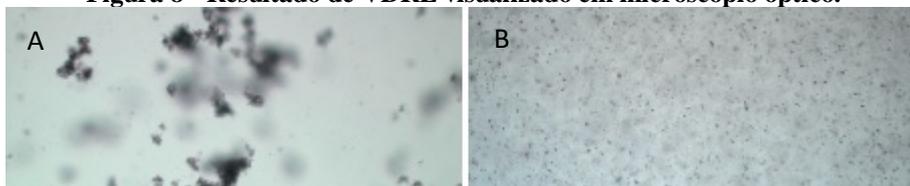
As reações de VDRL foram realizadas utilizando-se uma placa por amostra onde foram adicionados:

- 50 µl de soro no primeiro círculo da lâmina de VDRL (amostra pura);
- 50 µl de salina nos 7 círculos seguintes;
- No segundo círculo foram adicionados 50 µl de soro para dar início à diluição seriada na própria lâmina até a diluição 1:128;
- Uma gota de antígeno em cada círculo.

As lâminas foram colocadas em mesa agitadora na rotação de 180 rpm durante 4 minutos e a leitura do teste foi realizada em microscópio óptico em aumento de 100x.

Ao interpretar o teste observou-se a formação de grumos e partículas aglutinadas nos círculos, o que configura um resultado reagente. Quando essa floculação não aconteceu, o resultado foi considerado não reagente (Figura 8).

**Figura 8 - Resultado de VDRL visualizado em microscópio óptico.**



Legenda: A. Presença de floculação, B. Ausência de floculação. Fonte: Brasil, 2015.

#### 3.1.4.2 RPR

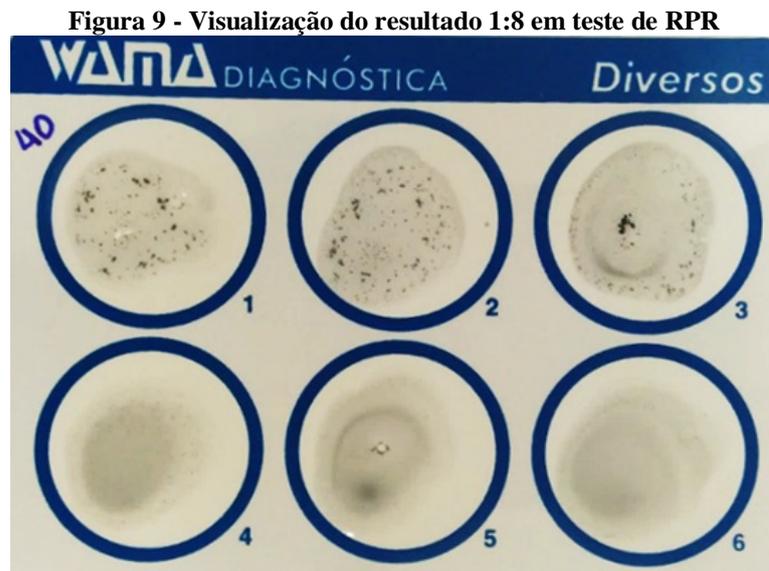
O teste RPR possui o mesmo princípio da floculação do VDRL, porém, esse teste apresenta carvão na sua composição, o que permite que o resultado seja visualizado a olho nu e cloreto de colina que dispensa a inativação da amostra. O teste RPR Wama<sup>®</sup> é realizado em placas de plástico reutilizáveis. O RPR foi realizado da seguinte forma, utilizando-se um cartão-teste para cada amostra:

- Adicionou-se 25 µl de amostra pura no primeiro círculo;
- Adicionou-se 25 µl de salina nos cinco círculos seguintes do cartão-teste proveniente do kit;
- Iniciou-se a diluição seriada, pipetando-se 25 µl de amostra no segundo círculo até o último e descartando-se o volume final da ponteira.

Os cartões-teste foram colocados em mesa agitadora na rotação de 100 rpm durante 8 minutos e os resultados foram observados a olho nu e fotografados.

A interpretação do teste consistiu na observação da formação de grumos e partículas aglutinadas nos círculos, o que configura um resultado reagente. Quando essa flocculação não aconteceu, o resultado foi considerado não reagente.

Ao final do processo de desfibrinação, uma alíquota de todas as amostras (com e sem azida de sódio) foi testada com dois testes não-treponêmicos, um de referência ASI™ VDRL Antigen Test e um teste convencional RPR Wama®. Esse processo de testagem foi realizado para verificar se há variação do título em uma metodologia de referência, na qual o antígeno utilizado é preparado momentos antes da execução do teste, em comparação com um teste comum na rotina dos laboratórios do Brasil, no qual o antígeno já está pronto para o uso.



Fonte: Acervo pessoal, 2017.

### 3.1.5 Armazenamento

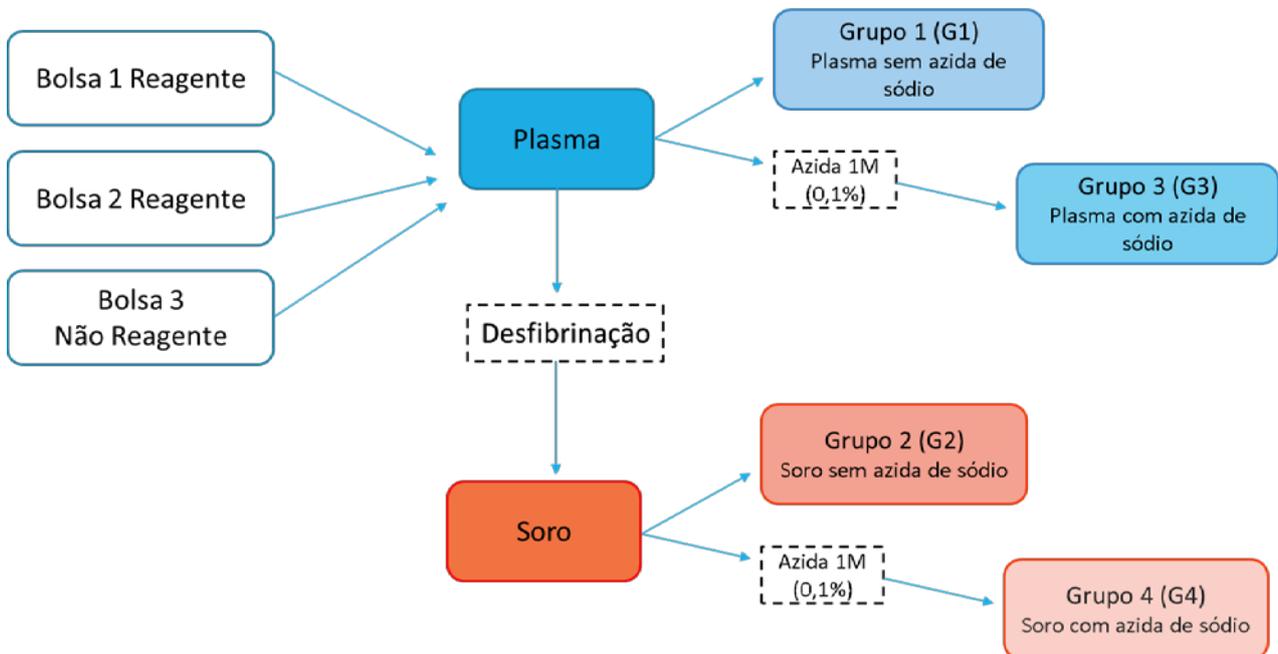
Após a verificação dos títulos de anticorpo, as amostras de soro e plasma das duas bolsas reagentes foram separadas de acordo com seu grupo e armazenadas em triplicatas, totalizando 60 alíquotas de 2ml da bolsa 1 (B1) e 60 alíquotas da bolsa 2 (B2). A bolsa 3 (não reagente) foi armazenada em alíquota única, totalizando 20 alíquotas. Desta forma, as amostras foram distribuídas em cinco caixas de armazenamento. Para a sequência do estudo, os grupos foram denominados da seguinte maneira: o grupo 1 (G1) composto por amostras de plasma sem o conservante azida de sódio; grupo 2 (G2) por amostras de soro sem azida de

sódio; grupo 3 (G3) por amostras de plasma com azida de sódio e o grupo 4 (G4) por amostras de soro com azida de sódio (Figura 10). As amostras biológicas das três bolsas utilizadas no estudo possuem alíquotas dos quatro grupos, porém, apenas a B3 (não reagente) não possui as alíquotas em triplicatas, conforme Figura 11.

Todas as alíquotas (140) foram armazenadas durante 90 dias em diferentes condições de temperatura, a saber: 80°C negativos (-80°C), -20°C, -20°C (para descongelamento em banho maria 37°C), 2-8°C, 30°C.

Foram utilizadas cinco caixas com a mesma distribuição de alíquotas da caixa representada na Figura 11, uma para cada condição de temperatura avaliada. As alíquotas contidas na caixa com as amostras armazenadas nas temperaturas de -80°C e uma das caixas da temperatura de -20°C foram descongeladas à temperatura ambiente (20-26°C) durante 1 hora e 30 minutos. A segunda caixa proveniente do freezer -20°C, foi descongelada em banho maria 37°C, em um período 30 minutos e as amostras armazenadas em 30°C e 2-8°C, já estavam prontas para o uso.

Quadro 1 - Fluxo do processamento das amostras



Fonte: Acervo pessoal, 2017

**Tabela 1 - Quantitativo das alíquotas**

Amostra	Tratamento	Conservação por até 90 dias (n° alíquotas)				Total de Alíquotas
		-80°C	-20°C	2-8°C	30°C	
G1	Plasma sem azida	6	12	6	6	30
G2	Soro sem azida	6	12	6	6	30
G3	Plasma com azida	6	12	6	6	30
G4	Soro com azida	6	12	6	6	30
	Não reagente	4	8	4	4	20
<b>Total</b>		<b>28</b>	<b>56</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>140</b>

Fonte: Acervo pessoal, 2017.

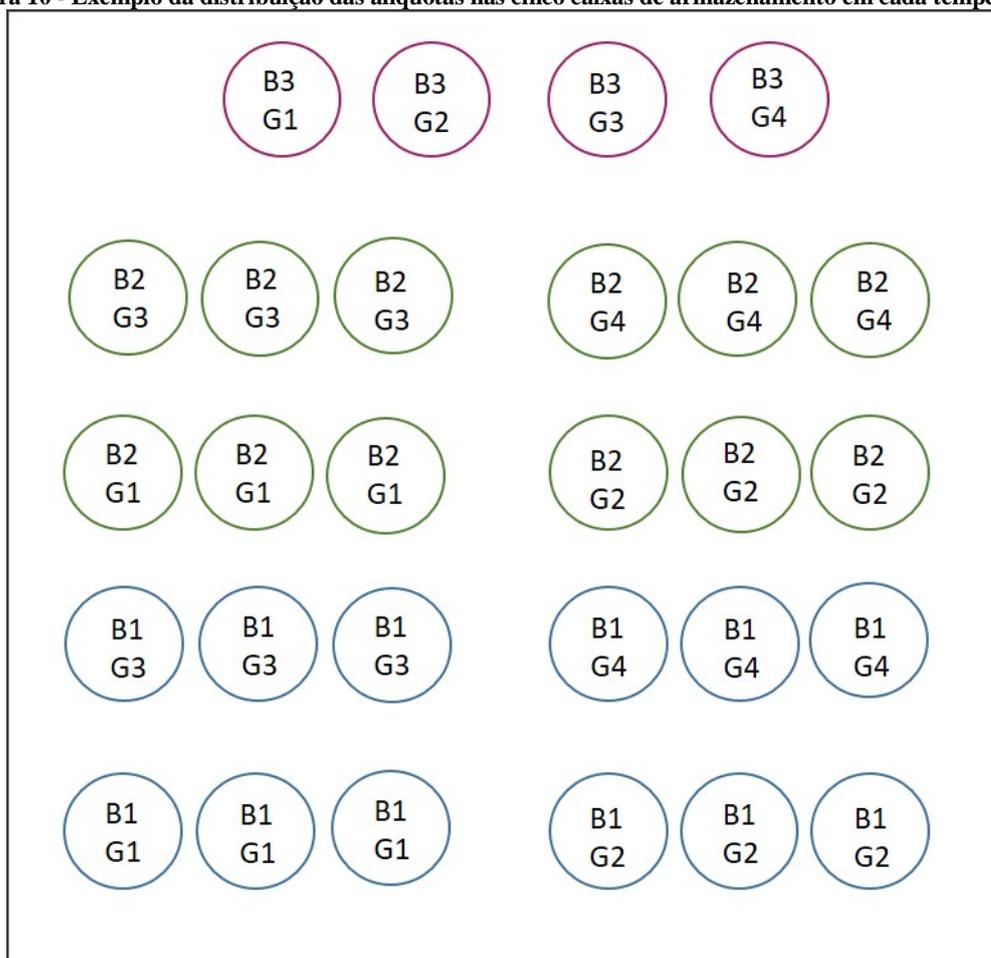
Foram realizados 12 ciclos de testagem em um período de 90 dias, sendo uma testagem a cada sete dias para as alíquotas das Bolsas 1 e 2 grupos 1, 2, 3 e 4, o que totalizou 80 alíquotas testadas, e uma testagem inicial e uma final no primeiro e décimo segundo ciclo de testagem para a bolsa 3 (NR) de todos os grupos, totalizando 20 alíquotas testadas. Após a finalização dos testes em cada semana, as amostras voltaram a ser armazenadas em sua respectiva condição, aguardando o próximo ciclo.

**Tabela 2 - Testes realizados por ciclo**

Ciclo	Amostras	Testes
<b>1° e 12°</b>	80 Alíquotas R	RPR, TR, FTA-Abs, CMIA
	20 Alíquotas NR	TR
<b>2° até 11°</b>	80 Alíquotas R	RPR e TR

Fonte: Acervo pessoal, 2017.

Figura 10 - Exemplo da distribuição das alíquotas nas cinco caixas de armazenamento em cada temperatura



Legenda:

B1: Bolsa 1 (reagente)	G1: Plasma sem azida
B2: Bolsa 2 (reagente)	G2: Soro sem azida
B3: Bolsa 3 (não reagente)	G3: Plasma com azida
	G4: Soro com azida

Fonte: Acervo pessoal, 2017.

### 3.1.6 Testes

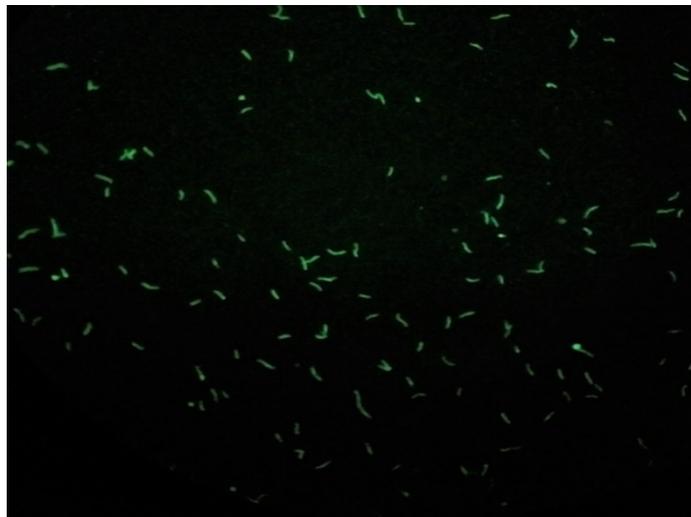
No primeiro dia após o acondicionamento das amostras em diferentes temperaturas, foi realizado o primeiro ciclo de testagem, compreendendo quatro metodologias para as amostras reagentes: FTA-Abs (Wama<sup>®</sup>), Quimiluminescência (IMMULITE Siemens<sup>®</sup>), RPR (Wama<sup>®</sup>) e Teste Rápido (Alere<sup>®</sup>). Essas quatro metodologias também foram utilizadas no décimo segundo ciclo de testagem. No caso das amostras NR, foi realizada apenas uma metodologia: Teste Rápido, e apenas no 1º e 12º ciclos. A partir do segundo ciclo de testagem até o décimo primeiro, para as bolsas reagentes, foram realizados o RPR e o Teste Rápido (Tabela 2).

### 3.1.6.1 FTA-Abs

A reação de FTA-Abs é uma técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Essa técnica utiliza *Treponema pallidum* (da cepa Nichols) fixado em áreas demarcadas de lâminas de vidro em que são feitas as reações. A execução do teste aconteceu da seguinte maneira: 1. Adsorção do soro em cultura de treponema Reiter: Foram misturadas uma parte de soro inativado e quatro partes de *sorbent* (solução absorvente), a qual é composta por extrato de cultura de treponema Reiter – não patogênico. Esse processo é utilizado para promover a remoção de anticorpos treponêmicos que são comuns à maioria dos treponemas não patogênicos que podem estar presentes na amostra de soro; 2. Foram pipetados 30 µl do soro adsorvido sobre a área demarcada da lâmina. Este processo foi realizado para todas as amostras, controles positivos e negativos; 3. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, durante 30 minutos; 4. Foi realizada a lavagem das lâminas (3 vezes) com tampão PBS, para remoção de anticorpos e outros componentes da amostra que não se ligaram à reação; 5. Foi adicionado, em cada demarcação das lâminas o conjugado fluorescente, que é soro antigamaglobulina humana conjugado ao isotiocianato de fluoresceína; 6. As lâminas foram incubadas novamente em câmara úmida, no escuro, durante 30 minutos; 7. Foi realizada a lavagem das lâminas (3 vezes) com tampão PBS, para remoção do conjugado não ligado. Finalmente, foram adicionadas algumas gotas de glicerina para cobrir a lâmina com a lamínula e a leitura foi realizada com microscópio de fluorescência.

Nas amostras reagentes foi possível visualizar em microscopia de fluorescência, a emissão de luz verde-maçã dos treponemas, exemplificado na Figura 11.

**Figura 11 - Microscopia de fluorescência.**



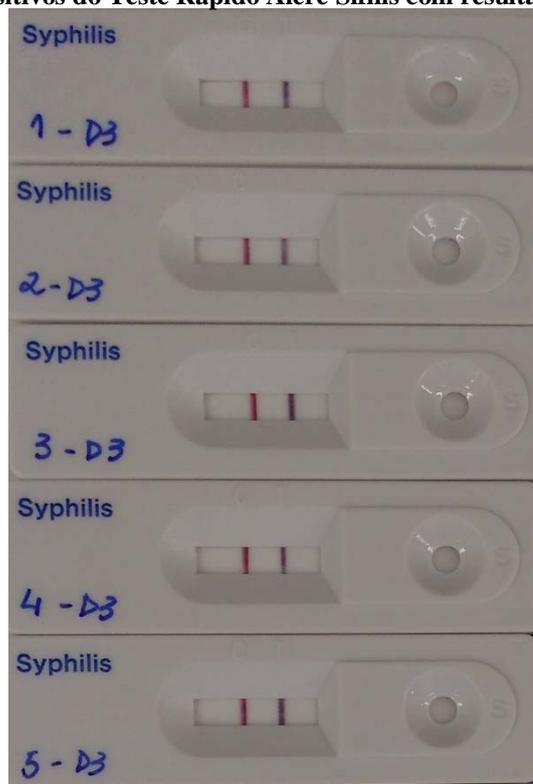
Legenda: Treponemas em lâminas de FTA-Abs, resultado reagente. Fonte: Acervo pessoal, 2017.

### 3.1.6.2 Teste Rápido

Os testes rápidos utilizados no diagnóstico da infecção pelo *Treponema pallidum* baseiam-se na tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral, que permite a detecção dos anticorpos específicos anti-*T. pallidum* no soro ou sangue total.

O Alere Sífilis contém uma membrana pré revestida com antígeno recombinante de *Treponema pallidum* na região teste (T). A mistura antígeno recombinante de *Treponema pallidum* acrescida do conjugado com ouro coloidal, amostra do paciente e solução diluente, migram cromatograficamente ao longo da membrana até a região de teste (T) resultando no surgimento de uma linha visível decorrente da formação do complexo antígeno-anticorpo-antígeno-ouro coloidal. A formação de uma linha visível na região de teste T indica a presença de anticorpos específicos (IgA, IgM e IgG) na amostra do paciente, conforme Figura 12. Quando os anticorpos específicos contra o *Treponema pallidum* (IgA, IgM e IgG) estão ausentes na amostra, não aparece a linha na região de teste (T).

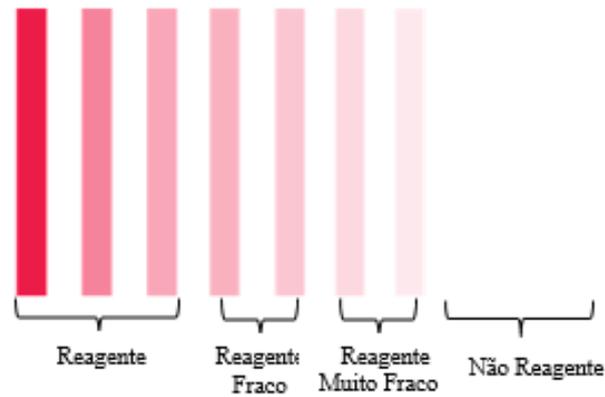
**Figura 12 - Dispositivos do Teste Rápido Alere Sífilis com resultado reagente**



Fonte: Acervo pessoal, 2017.

A leitura dos testes rápidos foi realizada utilizando-se o seguinte parâmetro de intensidade da linha Teste (T).

**Figura 13 - Parâmetros utilizados para avaliar a intensidade da linha teste (T)**

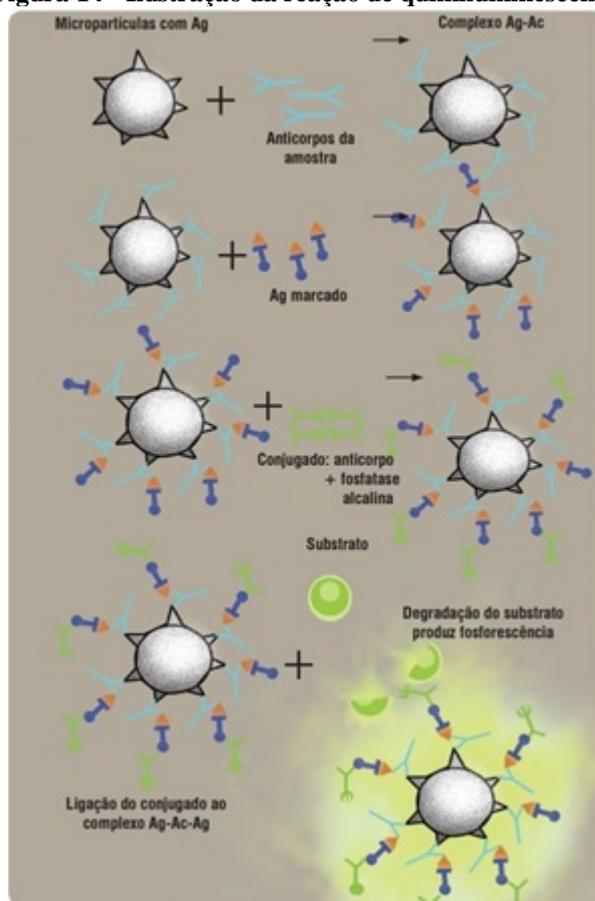


Legenda: Reagente (3), Reagente fraco (2), Reagente muito fraco (1), Não Reagente (0). Fonte: Imagem adaptada de Rudolf de Oliveira, R., 2017.

### 3.1.6.3 Quimiluminescência

O autoanalisador IMMULITE® Siemens 2000 é um equipamento de imunoensaio destinado à determinação de analitos usando a técnica de quimiluminescência, ilustrada na Figura 14. O equipamento utiliza uma fase sólida que é composta, no caso do teste para sífilis, por uma esfera de poliestireno revestida com uma camada de antígenos recombinantes purificados de *T. pallidum*, e uma fase líquida. A esfera é dispensada num tubo que funciona como reservatório da reação, local onde ocorre a lavagem, a incubação e a emissão de sinal de leitura da reação. A esfera revestida com antígeno é incubada com a amostra contendo o anticorpo que será pesquisado. Após a primeira lavagem é adicionado um antígeno específico marcado com fosfatase alcalina, formando-se um complexo em fase sólida antígeno-anticorpo-antígeno-enzima. Após o período de incubação, a esfera é lavada várias vezes por rotação rápida sobre o seu eixo vertical, provocando a dispersão do líquido pelas paredes do tubo e deixando-a totalmente seca. O líquido é recolhido numa câmara contida na unidade de teste, para que não haja contato com a esfera. Após essa etapa, obtêm-se uma separação eficiente da fase líquida e da fase sólida. Finalmente, adiciona-se à fase sólida um substrato quimiluminescente, que na presença da fosfatase alcalina é transformado em produto cuja concentração é proporcional à concentração do anticorpo presente na amostra (PISCALHO, 2014).

**Figura 14 - Ilustração da reação de quimiluminescência**



Fonte: Adaptado de Brasil, 2014.

### 3.1.7 Quantitativo de testes

Para este estudo foram utilizados kits comerciais de RPR, Teste rápido, FTA-Abs e Quimiluminescência, o quantitativo está descrito na Tabela 3.

**Tabela 3 - Quantitativo de testes utilizados para análise das amostras durante os 90 dias do estudo**

Kit	Nº alíquotas	Ciclos	Diluições	Total
RPR Wama	80 R	12	6	5.760
TR Alere Sífilis	80 R	12	0	960
TR Alere Sífilis	20 NR	2	0	40
FTA-Abs Wama	80 R	2	0	160
Immulate Syphilis	40 R	2	0	80
<b>Total</b>				<b>7.000</b>

Fonte: Acervo pessoal, 2017.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS OBTIDOS NA CARACTERIZAÇÃO E RECARACTERIZAÇÃO DAS BOLSAS DE PLASMA

Tabela 4 - Resultados obtidos na caracterização

Amostra	Metodologia	Resultado
Bolsa 1	Teste rápido	R
	FTA-Abs	R
	Quimiluminescência	R
	RPR	1/32
	VDRL	1/16
Bolsa 2	Teste rápido	R
	FTA-Abs	R
	Quimiluminescência	R
	RPR	1/16
	VDRL	1/8
Bolsa 3	Teste rápido	NR
	FTA-Abs	NR
	Quimiluminescência	NR
	RPR	NR
	VDRL	NR

Foi realizado o teste de VDRL para a amostra não reagente após o processo de desfibrinação, a qual permaneceu sem a presença de cristais e manteve seu resultado não reagente.

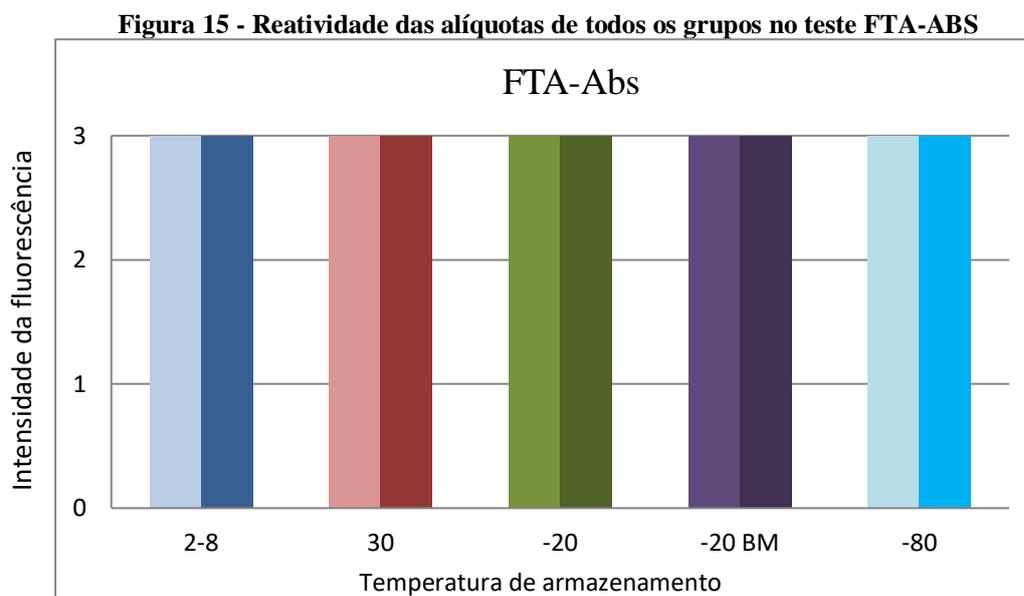
Tabela 5 - Resultados obtidos na recaracterização

Amostra	Metodologia	Resultado	Metodologia	Resultado	Metodologia	Resultado
B1 G1	VDRL	1/16	RPR	1/32	Teste Rápido	R
B1 G2	VDRL	1/16	RPR	1/32	Teste Rápido	R
B1 G3	VDRL	1/16	RPR	1/32	Teste Rápido	R
B1 G4	VDRL	1/16	RPR	1/32	Teste Rápido	R
B2 G1	VDRL	1/8	RPR	1/16	Teste Rápido	R
B2 G2	VDRL	1/8	RPR	1/16	Teste Rápido	R
B2 G3	VDRL	1/8	RPR	1/16	Teste Rápido	R
B2 G4	VDRL	1/8	RPR	1/16	Teste Rápido	R
B3 G1	VDRL	NR	RPR	NR	Teste Rápido	NR
B3 G2	VDRL	NR	RPR	NR	Teste Rápido	NR
B3 G3	VDRL	NR	RPR	NR	Teste Rápido	NR
B3 G4	VDRL	NR	RPR	NR	Teste Rápido	NR

## 4.2 RESULTADOS OBTIDOS EM ATÉ 90 DIAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

### 4.2.1 FTA-Abs

O FTA-Abs foi realizado durante dois ciclos do estudo, na primeira semana e na décima segunda, para todas as amostras reagentes. Observou-se reatividade em todas as amostras (Figura 15).

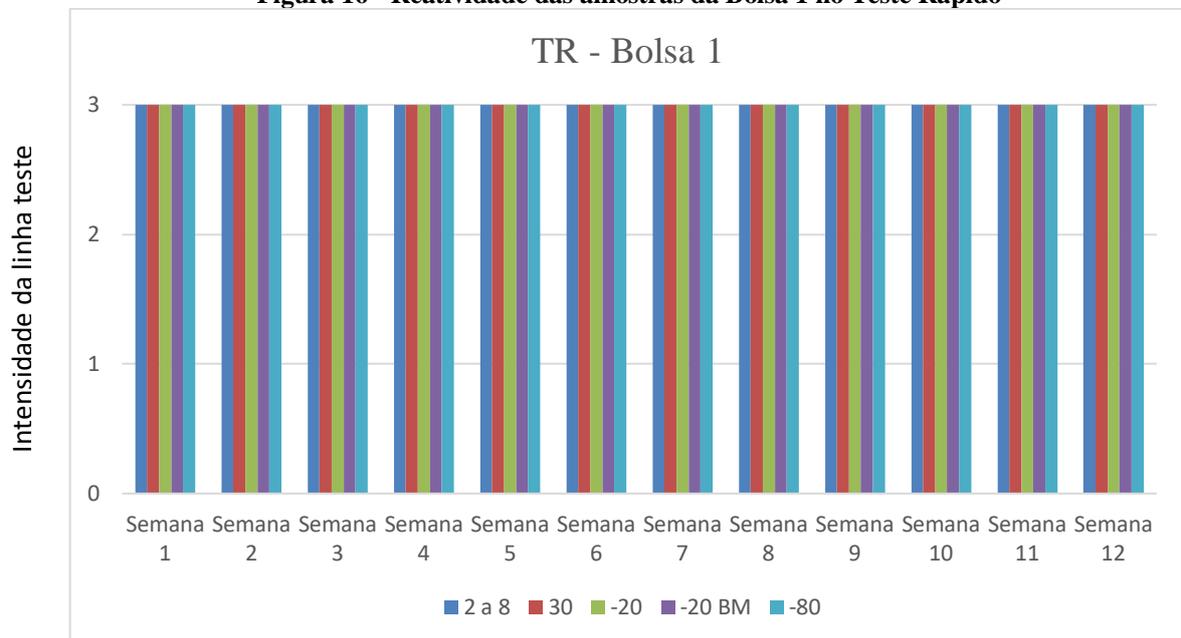


Legenda: A diferença entre as cores das colunas indica, respectivamente, a primeira semana de testagem (cor clara) e décima segunda semana de testagem (cor escura). Fonte: Acervo pessoal, 2017.

#### 4.2.2 Teste Rápido

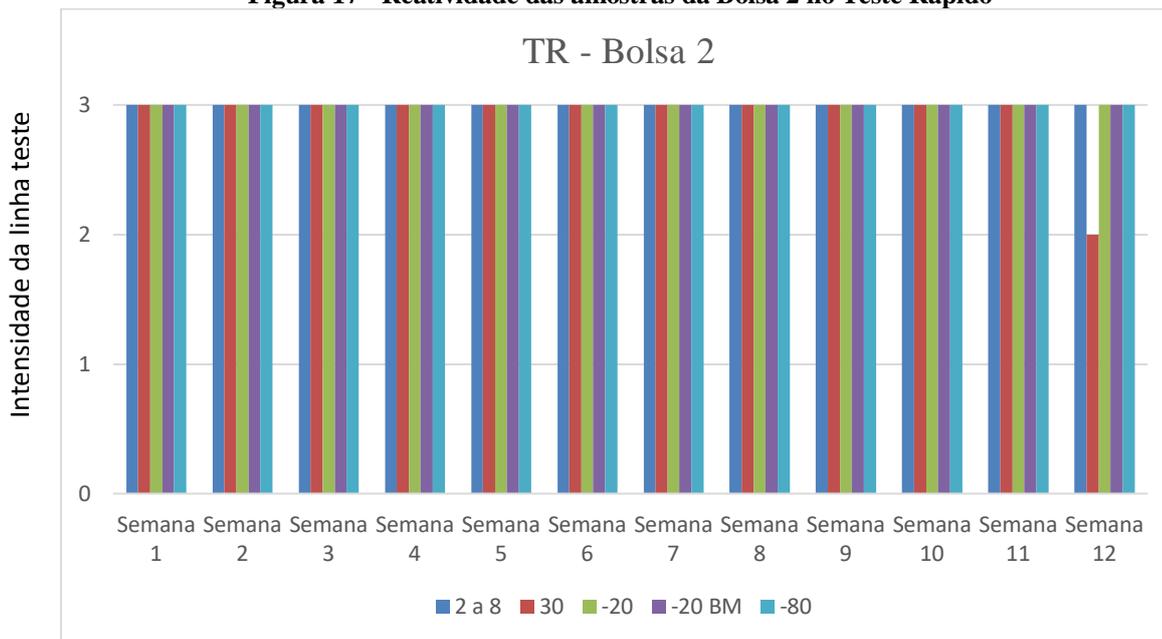
Os testes rápidos foram realizados nos 12 ciclos de testagem do estudo. Observou-se a manutenção da reatividade em todas as amostras da bolsa 1 (Figura 16). Nas amostras da bolsa 2, foi observado o decaimento da reatividade apenas nas amostras acondicionadas na temperatura de 30°C no último ciclo de testagem (Figura 17). A bolsa 3 manteve-se não reagente (Figura 17).

**Figura 16 - Reatividade das amostras da Bolsa 1 no Teste Rápido**



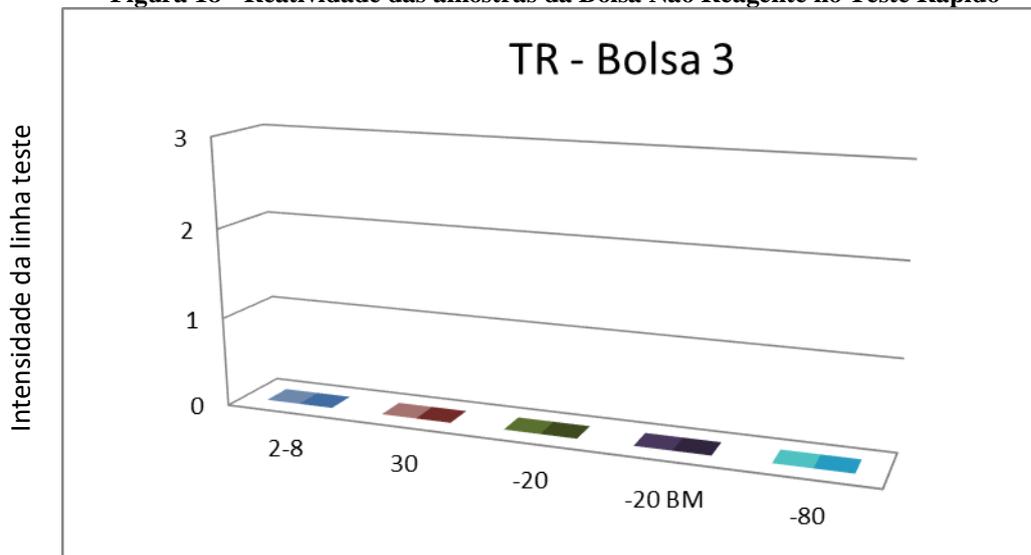
Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 17 - Reatividade das amostras da Bolsa 2 no Teste Rápido**



Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 18 - Reatividade das amostras da Bolsa Não Reagente no Teste Rápido**



Legenda: A diferença entre as cores das colunas indica, respectivamente, a primeira semana de testagem (cor clara) e décima segunda semana de testagem (cor escura). Fonte: Acervo pessoal, 2017.

### 4.2.3 Quimiluminescência

Foram admitidos os seguintes valores para interpretação dos resultados do teste automatizado Sífilis IMMULITE Siemens: Não reagente index  $<0,9$ ; indeterminado index entre  $0,9-1,1$ ; Reagente index  $>1,1$ .

**Tabela 6 - Resultados qualitativos obtidos na Quimiluminescência para Sífilis**

Temperatura	Amostra	Semana 1	Semana 12
BM -20°	B1 PSA	R	R
BM -20°	B1 SSA	R	R
BM -20°	B1 PCA	R	R
BM -20°	B1 SCA	R	R
BM -20°	B2 PSA	R	R
BM -20°	B2 SSA	R	R
BM -20°	B2 PCA	R	R
BM -20°	B2 SCA	R	R
2-8°C	B1 PSA	R	R
2-8°C	B1 SSA	R	R
2-8°C	B1 PCA	R	R
2-8°C	B1 SCA	R	R
2-8°C	B2 PSA	R	R
2-8°C	B2 SSA	R	R
2-8°C	B2 PCA	R	R
2-8°C	B2 SCA	R	R
30°C	B1 PSA	R	R
30°C	B1 SSA	R	R
30°C	B1 PCA	R	R
30°C	B1 SCA	R	R
30°C	B2 PSA	R	R
30°C	B2 SSA	R	R
30°C	B2 PCA	R	R
30°C	B2 SCA	R	R
80°C	B1 PSA	R	R
80°C	B1 SSA	R	R
80°C	B1 PCA	R	R
80°C	B1 SCA	R	R
80°C	B2 PSA	R	R
80°C	B2 SSA	R	R
80°C	B2 PCA	R	R
80°C	B2 SCA	R	R
-20	B1 PSA	R	R
-20	B1 SSA	R	R
-20	B1 PCA	R	R
-20	B1 SCA	R	R
-20	B2 PSA	R	R
-20	B2 SSA	R	R
-20	B2 PCA	R	R

-20                      B2 SCA                      R                      R

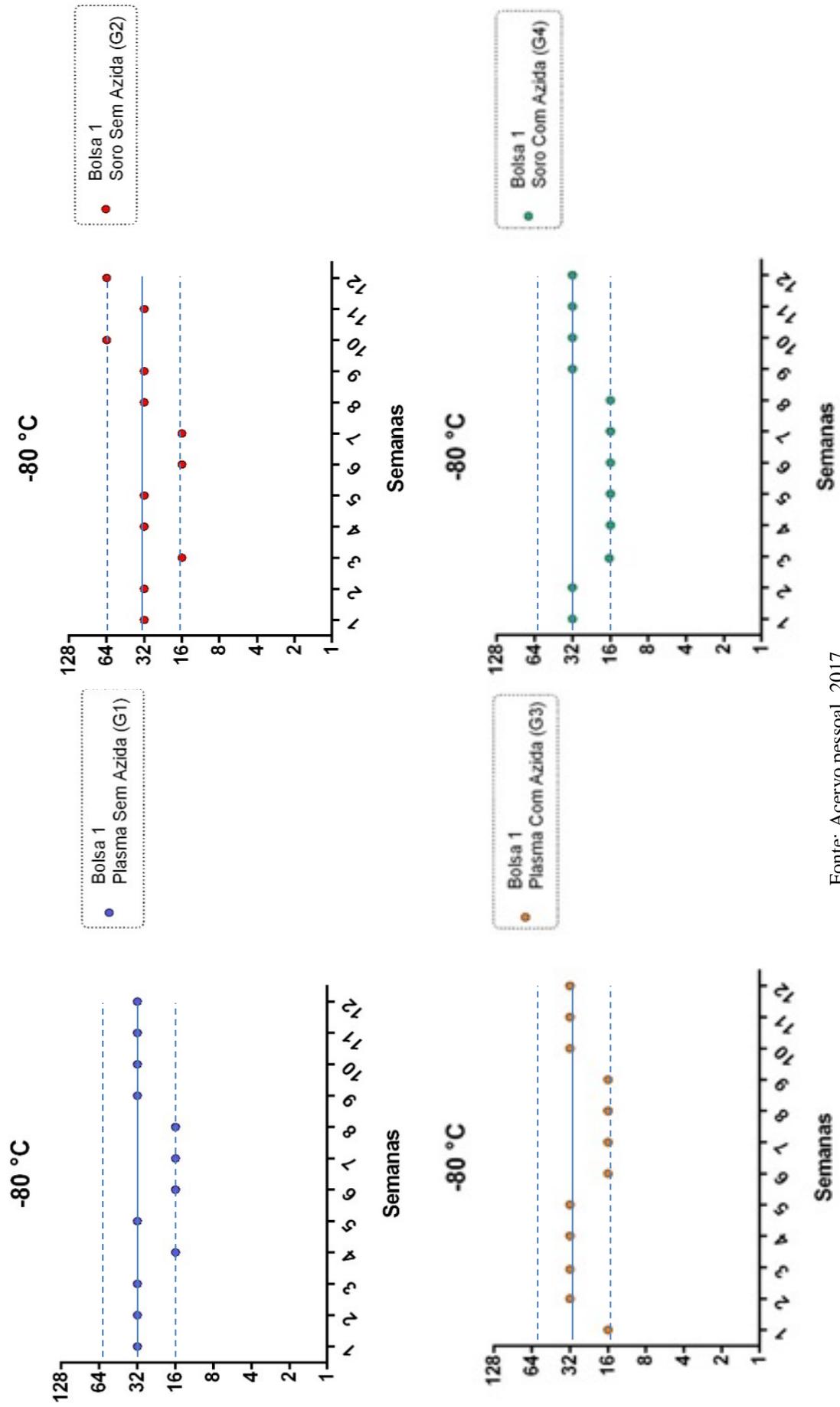
---

Legenda Tabela 6. B1: Bolsa 1, B2: Bolsa 2, PSA: Plasma sem azida; SSA: Soro sem azida; PCA: Plasma com azida; SCA: Soro com azida, R: Reagente. Fonte: Acervo pessoal, 2017.

#### 4.2.4 RPR

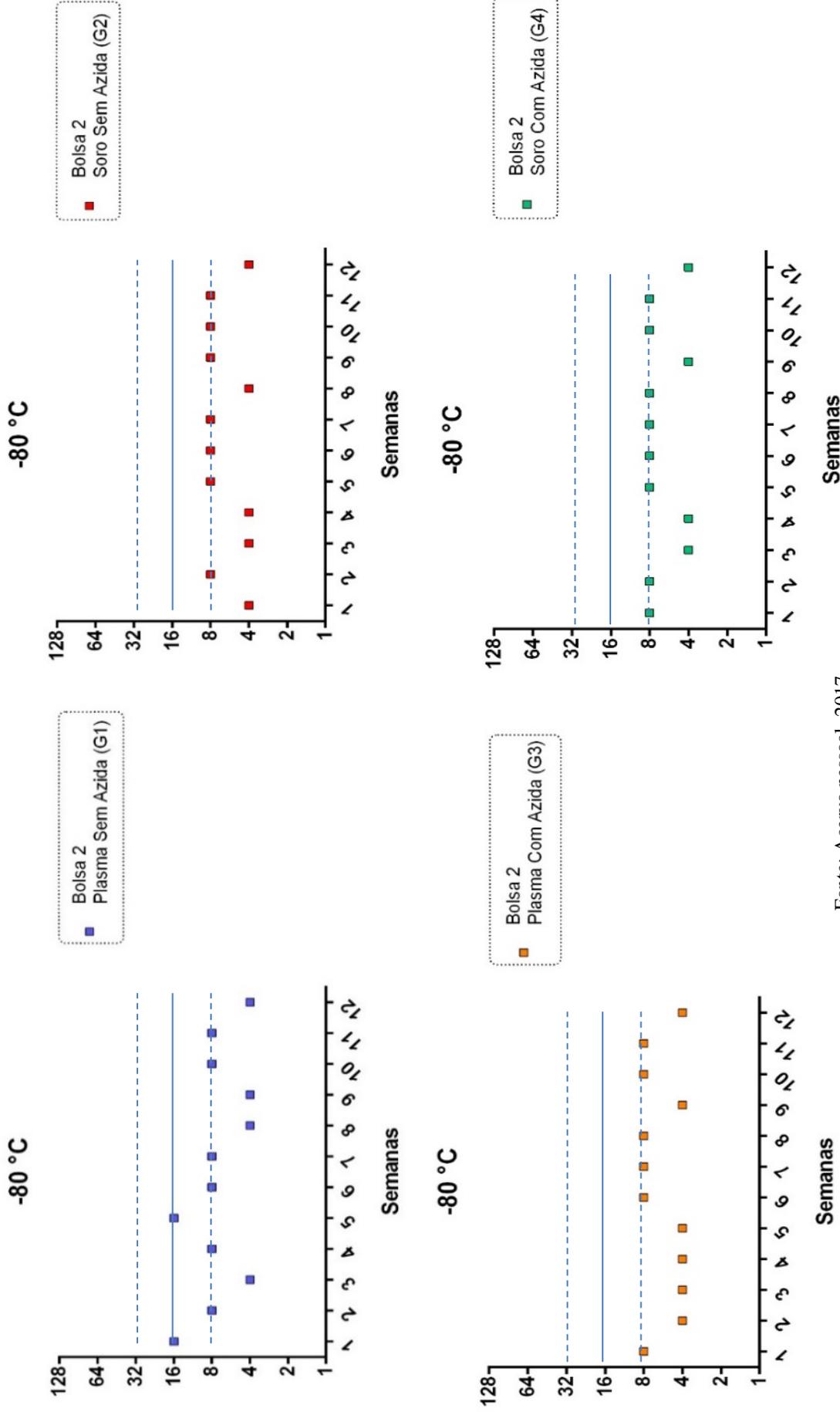
Na recharacterização realizada após o processo de desfibrinação, os títulos no teste de RPR das amostras permaneceram iguais aos da caracterização das bolsas (B1 – 1:32 e B2 – 1:16) e foram adotados como referência para avaliar o desempenho das alíquotas desafiadas em diferentes temperaturas. A seguir estão apresentados os resultados das alíquotas testadas no teste RPR após conservação em -80°C (Figuras 19 e 20), -20°C (Figuras 21 e 22), -20°C Descongeladas em banho maria 37°C (Figuras 23 e 24), 2-8°C (Figuras 25 e 26) e 30°C (Figuras 27 e 28) durante os 12 ciclos de testagem.

Figura 19 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da bolsa 1, armazenadas na temperatura de -80°C



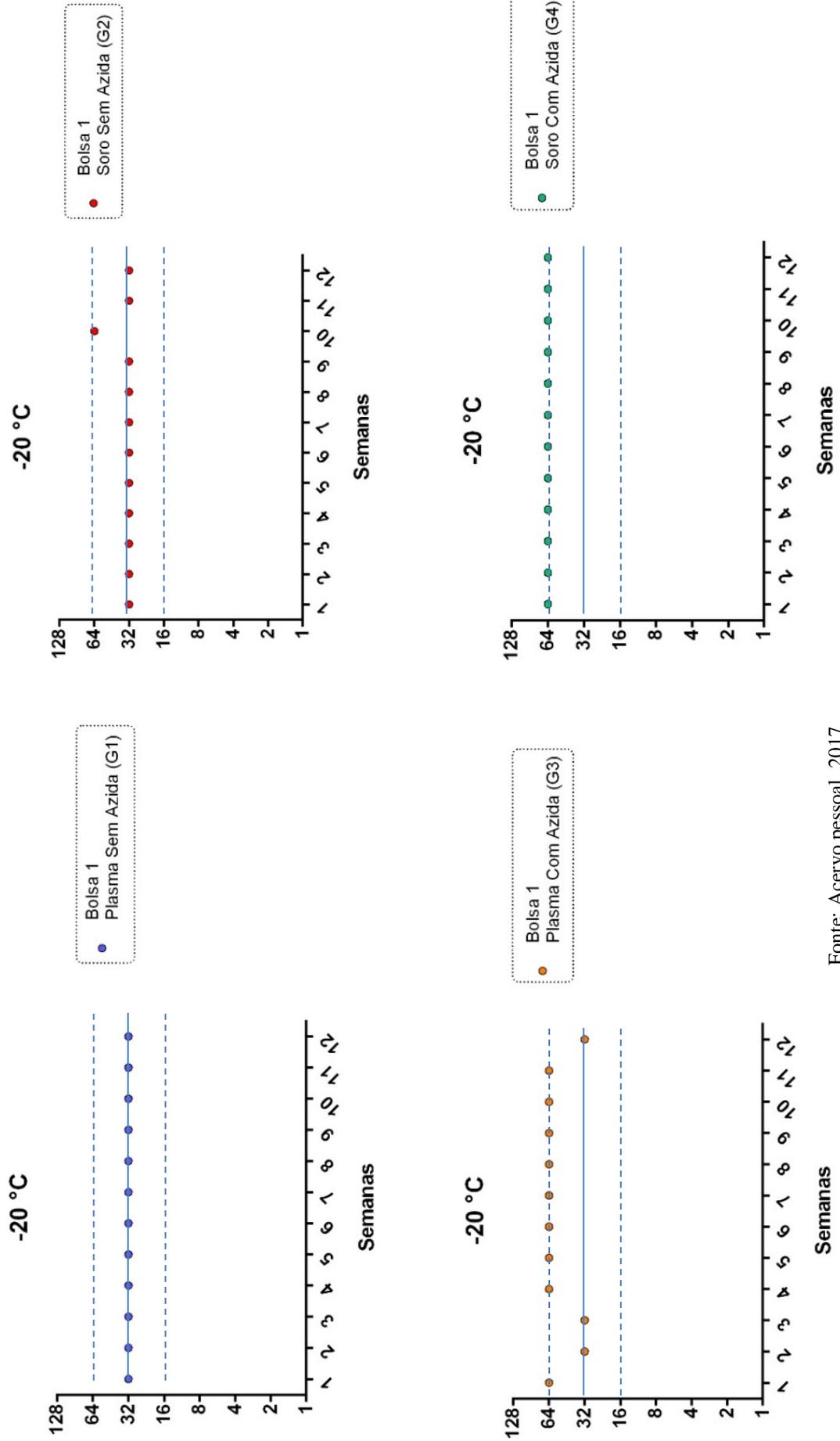
Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 20 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 2 armazenadas na temperatura de -80°C



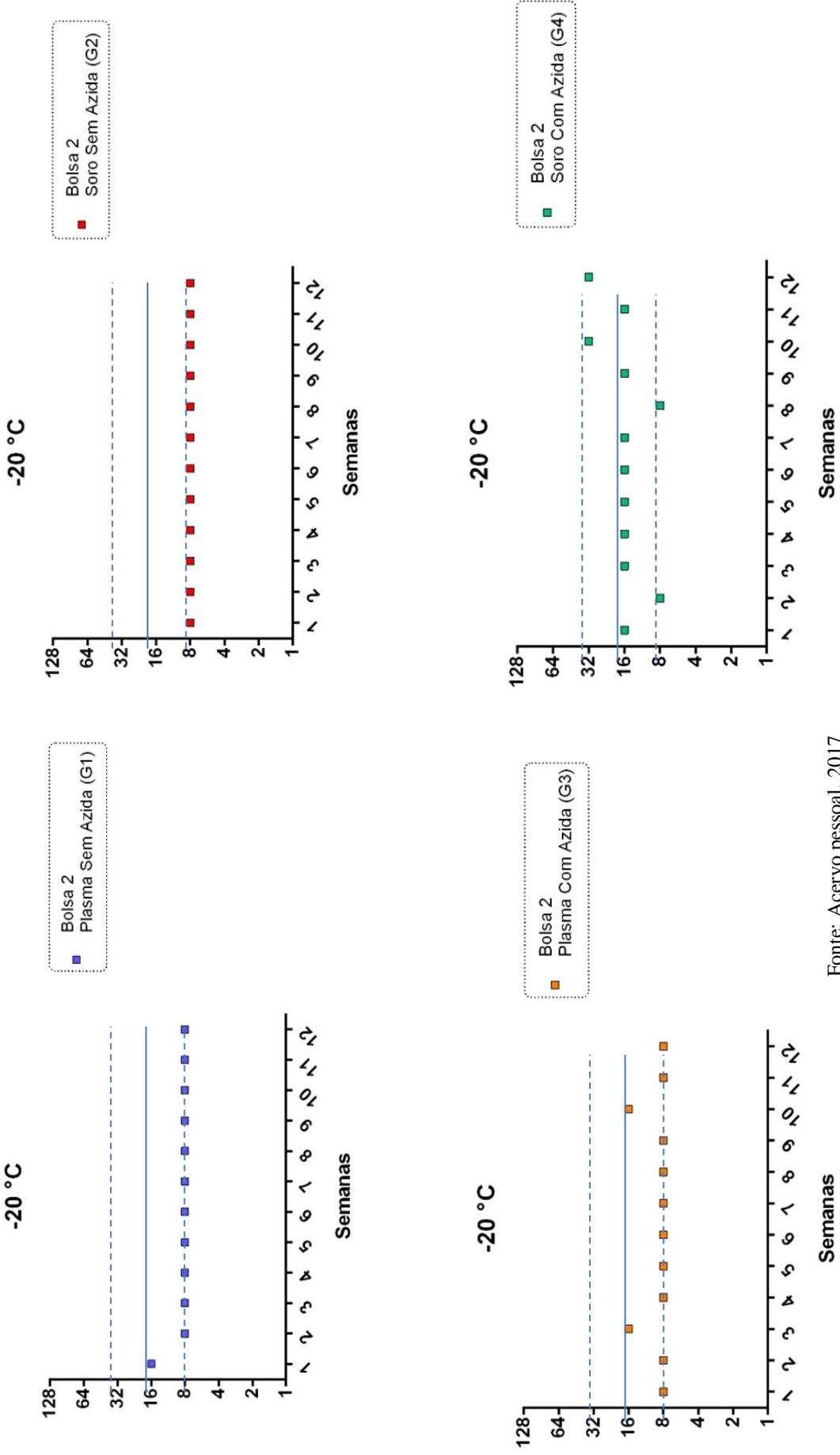
Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura\_21 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 1 armazenadas na temperatura de -20°C



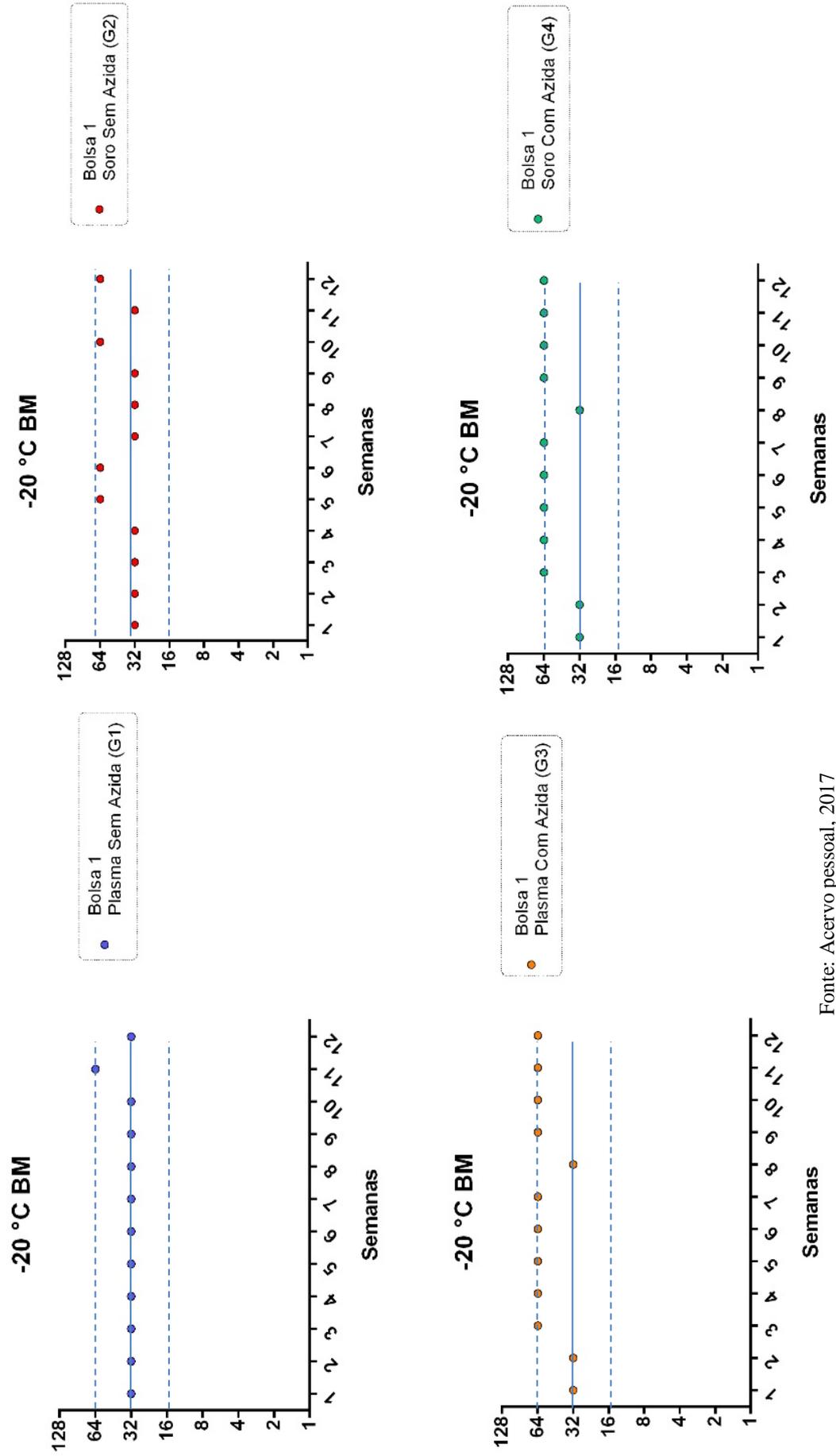
Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 22 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 2 armazenadas na temperatura de -20°C



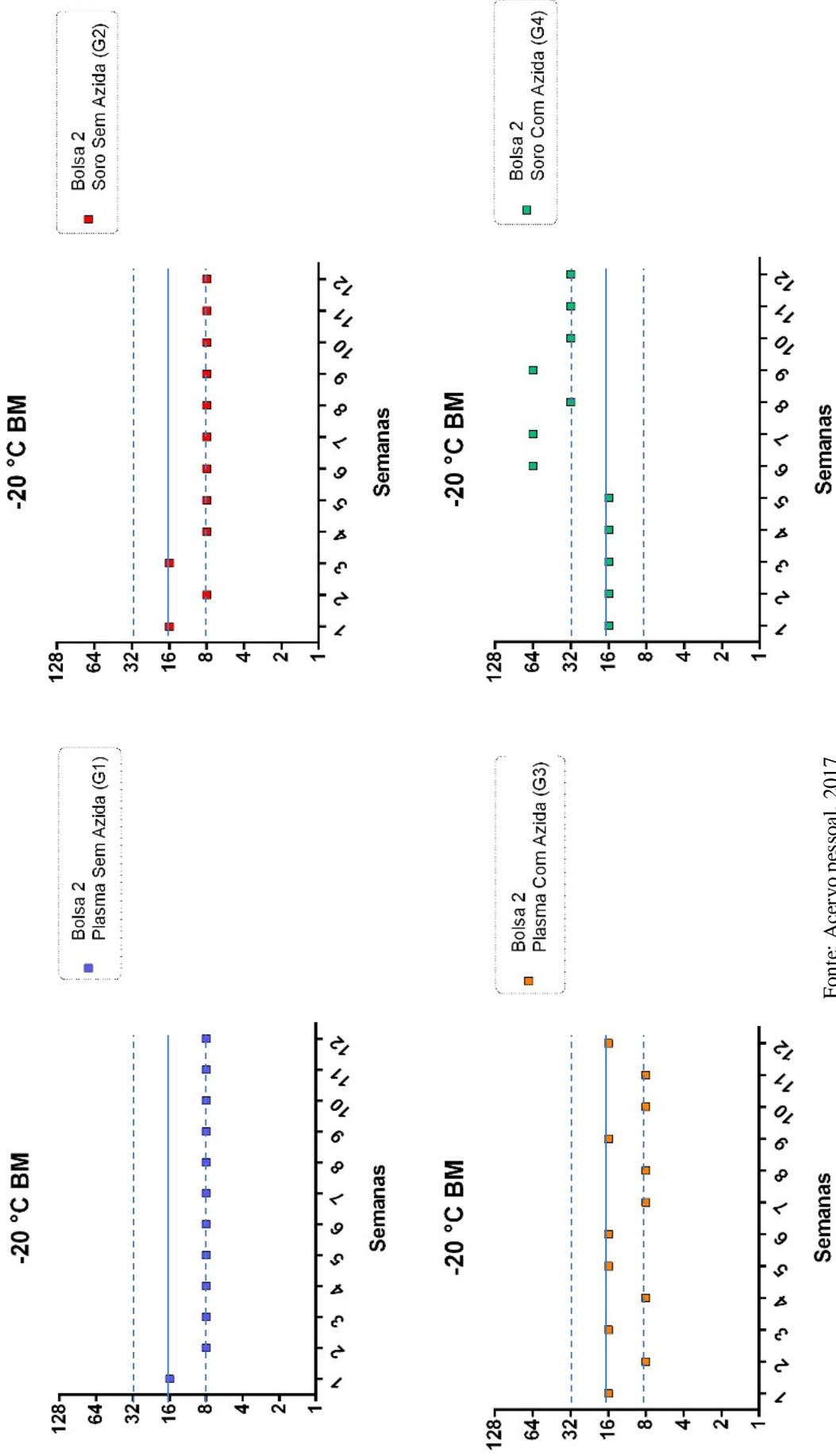
Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 23 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 1 armazenadas na temperatura de -20°C e descongeladas em Banho-maria 37°C



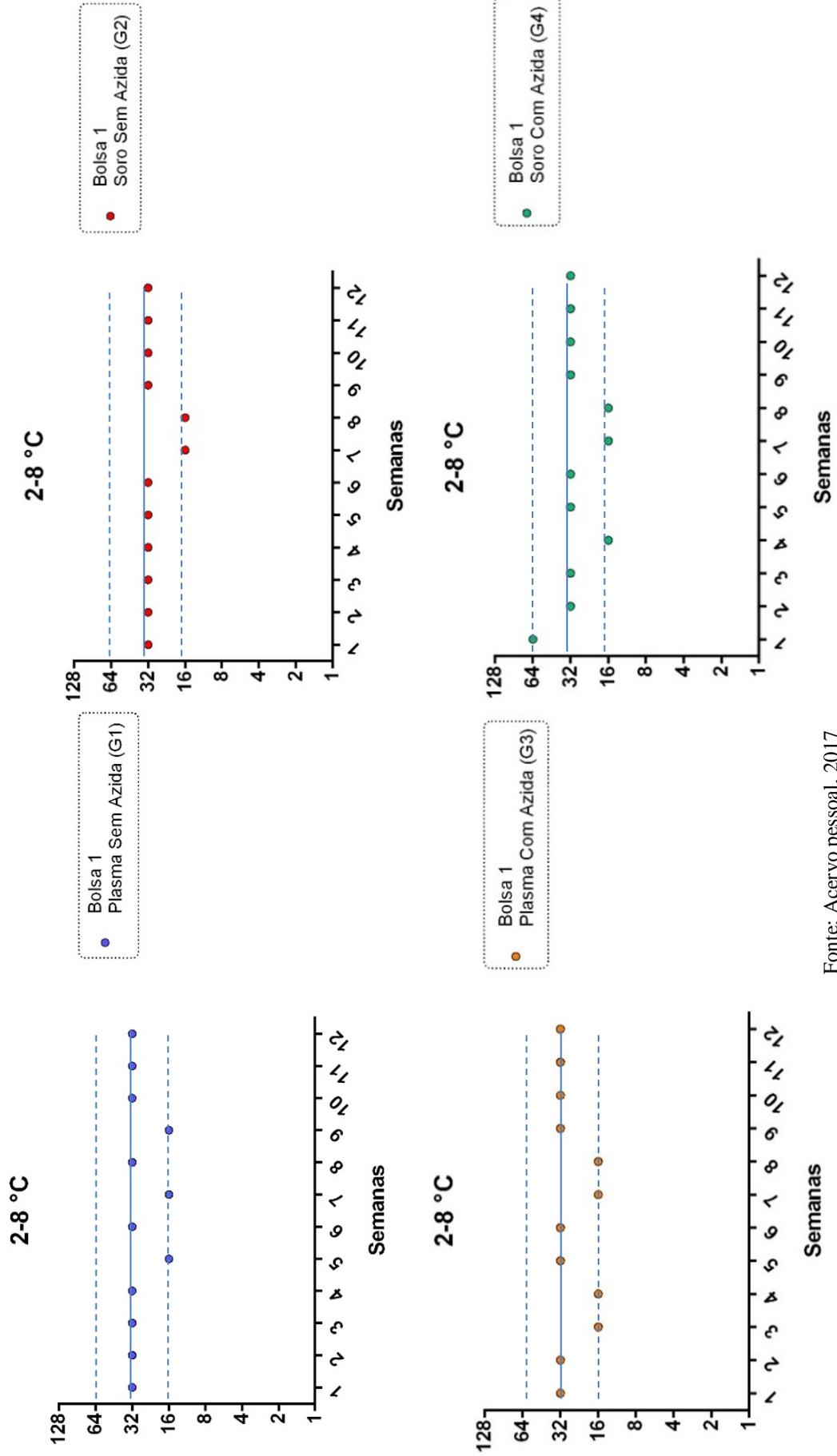
Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 24 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 2 armazenadas na temperatura de -20°C e descongeladas em Banho-maria 37°C



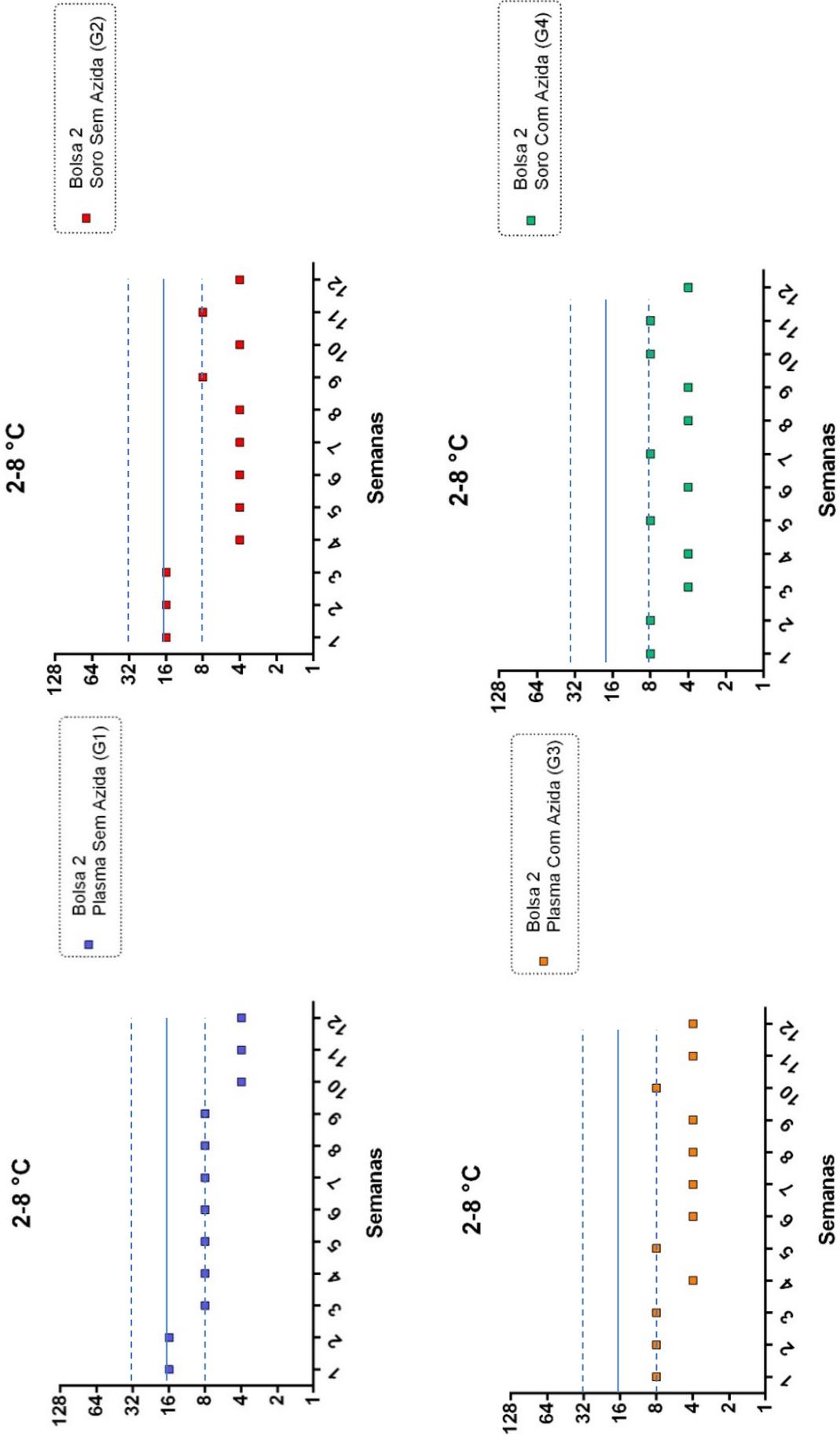
Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 25 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras realizadas para as amostras dos grupos G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 1 armazenadas na temperatura de 2-8°C

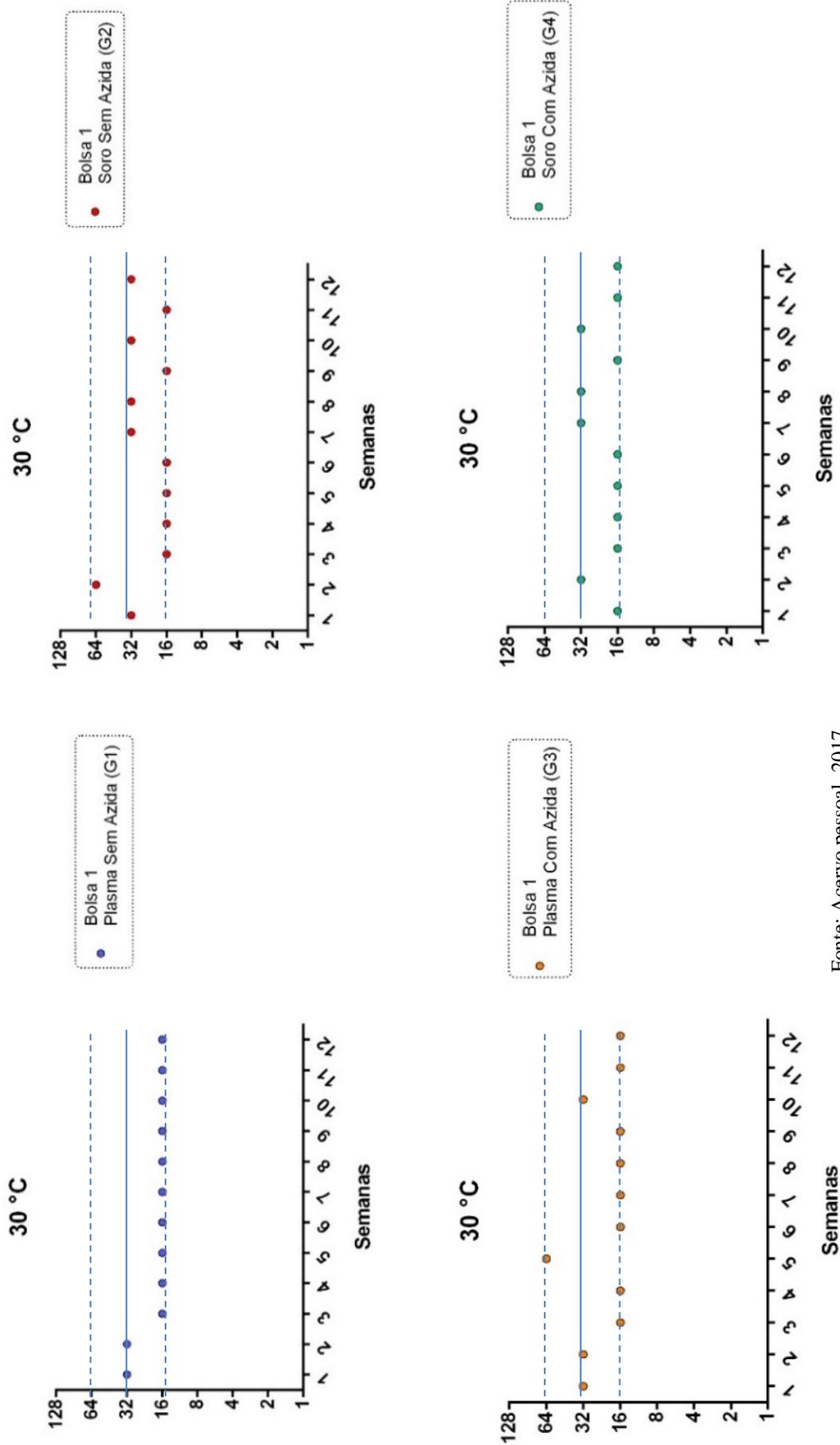


Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 26 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 2 armazenadas na temperatura de 2-8°C

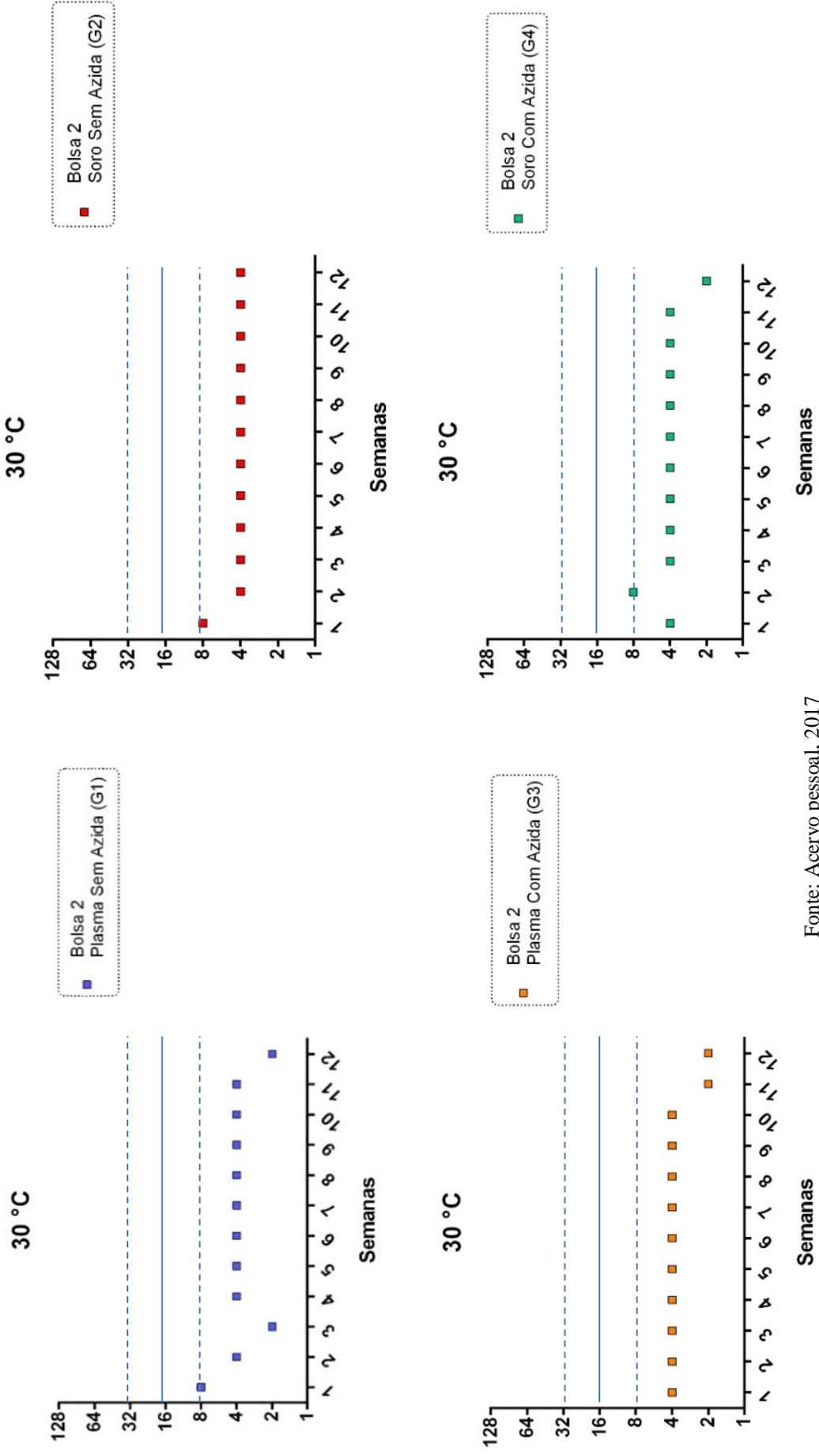


**Figura 27 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 1 armazenadas na temperatura de 30°C**



Fonte: Acervo pessoal, 2017

Figura 28 - Valores dos títulos verificados no RPR em todas as testagens realizadas para as amostras do G1, G2, G3 e G4 da Bolsa 2 armazenadas na temperatura de 30°C



Fonte: Acervo pessoal, 2017

**Tabela 7 - Resultados iniciais e finais dos títulos do RPR por grupo e temperatura**

	B1 80°C	B2 80°C	B1 20°C	B2 20°C	B1 20°C BM	B2 20°C BM	B1 2- 8°C	B2 2- 8°C	B1 30°C	B2 30°C
G1	32/32	16/4	32/32	16/8	32/32	16/8	32/32	16/4	32/16	8/2
G2	64/32	8/4	32/32	8/8	32/64	16/8	32/32	16/4	32/32	8/4
G3	16/32	8/4	64/32	8/8	32/64	16/16	32/32	8/4	32/16	4/2
G4	32/32	8/4	64/64	16/32	32/64	16/32	32/32	8/4	16/16	4/2

Legenda: Valor inicial RPR/Valor final RPR. Fonte: Acervo Pessoal, 2017.

### 4.3 ALTERAÇÕES DAS ALÍQUOTAS

No decorrer do estudo foram observadas alterações em algumas alíquotas, como o aparecimento de fungos, coágulos e grumos.

**Figura 19 - Presença de fungos nas amostras de soro decorrente das condições de armazenamento**



Legenda: Presença de fungos nas amostras de soro sem azida de sódio acondicionadas em 30°C. Fonte: Acervo pessoal, 2017.

**Figura 20 - Presença de coágulo na amostra de plasma**



Legenda: Coágulo nas amostras de plasma com azida de sódio da condição 2-8°C, após 6 semanas de incubação. Fonte: Acervo pessoal, 2017.

Nas alíquotas de plasma armazenadas em  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  (com e sem azida de sódio) foi observada a presença de pequenos grumos no final do estudo;

As alíquotas armazenadas em  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongeladas em banho maria  $37^{\circ}\text{C}$  não apresentaram grumos ou coágulos.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisada a presença de anticorpos nas amostras selecionadas, sendo esses utilizados para fins de diagnóstico e monitoramento do tratamento da sífilis. Embora tenhamos poucas informações clínicas das amostras utilizadas, sabe-se que se trata de sífilis secundária, e por isso, admite-se que os anticorpos sejam majoritariamente da classe IgG. Os anticorpos IgG são moléculas compostas por dois diferentes tipos de cadeias polipeptídicas e possuem peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Cada uma das moléculas de IgG é constituída por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Uma das cadeias possui aproximadamente 50 kDa (denominada cadeia pesada), e outra de 25 kDa (cadeia leve). As cadeias pesadas são ligadas umas às outras por ligações dissulfídicas, e cada cadeia pesada também é ligada a uma cadeia leve por ligações dissulfídicas. Na molécula de imunoglobulina, as duas cadeias pesadas e as duas cadeias leves são iguais, o que confere à molécula de anticorpo dois sítios idênticos de ligação ao antígeno, proporcionando a capacidade de ligar-se simultaneamente a duas estruturas idênticas (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Os anticorpos podem ser desnaturados em várias condições. Essas condições incluem mudanças de temperatura e diferentes estágios de processamento. O presente estudo teve em seus objetivos, avaliar a possível desnaturação dos anticorpos anti-*Treponema pallidum* e anticorpos não-treponêmicos (anticardiolipínicos) pesquisados nos testes para diagnóstico da sífilis. Segundo Wang e colaboradores (2007), em comparação com outras proteínas, os anticorpos parecem ser mais resistentes ao estresse térmico, porém, podem ocorrer agregados de anticorpos, os quais são a manifestação mais comum de instabilidade física. Os agregados podem se formar facilmente no estado líquido e sólido sob diferentes condições. Os agregados são, frequentemente, consequências de interações proteína-proteína, um processo influenciado pela taxa de difusão e restrições geométricas nos sítios de interação. Temperatura, pH, viscosidade, força iônica, mudança na concentração de proteínas, ciclos de congelamento e descongelamento, agitação, longo tempo de armazenamento, entre outros fatores influenciam significativamente a taxa de agregação.

Alguns autores acreditam que baixas temperaturas reduzem a interação hidrofóbica, a qual é a maior força no dobramento proteico. Em baixas temperaturas, as regiões dos anticorpos tornam-se mais expostas ao solvente e levam ao aumento da interação hidrofóbica intermolecular, causando agregação. Em estreita relação com o efeito de baixa temperatura,

processos de congelamento e descongelamento frequentemente induzem agregação de proteínas, mas esse processo é reversível (WANG et al., 2007). Esse fato pode explicar a oscilação nos títulos encontrados nos testes de RPR, observada durante o estudo, conforme Figuras 19 a 28.

Embora os testes não-treponêmicos apresentem semelhanças em sua especificidade e sensibilidade, esses testes podem apresentar reatividade diferente em relação a uma mesma amostra (é admitida variação de mais ou menos um título), pois suas diferentes suspensões antigênicas são constituídas por micelas decorrentes de arranjo aleatório dos componentes do antígeno (cardiolipina, colesterol e lecitina) (BRASIL, 2015). A estrutura micelar é mantida por forças iônicas relativamente fracas, o que pode ser explicado pelo pequeno tempo de duração do antígeno clássico de VDRL que não utiliza conservante. A degradação das micelas é sentida pela diminuição da reatividade de amostras com títulos conhecidos. No caso dos antígenos prontos para uso, como o RPR, há adição de conservante (estabilizante das micelas), porém da mesma forma, pode-se observar diminuição da reatividade se um antígeno é submetido a procedimentos de oscilação de temperatura (armazenamento em geladeira, aquecimento à temperatura ambiente para os testes). Este tipo de variação não foi motivo de observação no presente estudo, porém uma mesma suspensão antigênica pode ter sido utilizada totalmente em um dia de testes enquanto outra (embora do mesmo lote) pode ter sido utilizada por várias semanas e influído na variação da reatividade. A leitura dos resultados dos testes não-treponêmicos deste estudo foram realizados apenas pela autora, e nos casos de dúvida por mais dois observadores, neste caso acredita-se em pouca interferência subjetividade da leitura desses testes para explicar a variabilidade de títulos em algumas amostras.

É possível visualizar na Tabela 7 os valores iniciais e finais dos títulos dos anticorpos não-treponêmicos observados no teste RPR. Adotando o critério de aceitabilidade de uma diluição do título para mais e uma diluição do título para menos, nas amostras da B1 (título da caracterização 1:32), aceitou-se a variação entre os títulos de 1:16 e 1:64, para a B2 (título da caracterização 1:16) aceitou-se a variação entre 1:8 e 1:32. Dessa forma, todos os títulos observados na bolsa 1 estão de acordo com o critério de aceitabilidade adotado, portanto, não demonstraram alterações significativas no final do estudo.

Brey e colaboradores (1994) realizaram um estudo para verificar a imunorreatividade dos anticorpos anticardiolipínicos após ciclos de congelamento e descongelamento e no estudo foi observado que os níveis de IgG e IgM começaram a cair no terceiro ciclo de congelamento e descongelamento, mas foi observada uma maior significância estatística no

decaimento da reatividade apenas para os anticorpos anticardiolipínicos IgG. Por outro lado, estudo realizado por Castro e Jost (2013) avaliou os efeitos de 10 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento em oito amostras, utilizando um teste treponêmico (ELISA) e um teste não-treponêmico (RPR). Seis das oito amostras de soro demonstraram redução de uma diluição no título do anticorpo no RPR, e duas amostras mantiveram o título original. Todas as amostras continuaram reagentes até o final do estudo. Isso demonstra que o armazenamento de soro reagente para sífilis pode resistir a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento sem afetar o seu uso como um marcador sorológico confiável. Soro congelado é uma importante fonte de material biológico para avaliação de ensaios sorológicos e na maioria dos casos, amostras congeladas são abundantes e disponíveis, mas comumente armazenadas sem planejamento para seu uso futuro. Alguns pesquisadores fazem alíquotas das amostras com o propósito de prevenir ciclos repetidos de congelamento e descongelamento e preservar a estabilidade do anticorpo. No entanto, em muitos laboratórios, essa prática não é realizada pela falta de espaços suficientes em freezer.

Os resultados dos títulos observados na bolsa 2, apresentaram oscilação maior do que um título para mais ou para menos, demonstrando que a variabilidade no título pode ser ocasionada por algum fator intrínseco da amostra, pois essas alterações foram observadas nos quatro grupos do estudo e não foram observadas na bolsa 1. Para a bolsa 2 apenas as alíquotas armazenadas em  $-20^{\circ}\text{C}$ , descongeladas em temperatura ambiente e descongeladas em banho maria, apresentaram os títulos dentro do critério de aceitabilidade, sugerindo uma condição ótima de armazenamento das amostras, a qual provavelmente desfavorece a agregação dos anticorpos. Dessa forma, houve um declínio na reatividade dos anticorpos anticardiolipínicos após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Para verificar possível interferência de outros fatores que pudessem justificar a diferença de comportamento entre as amostras das bolsas 1 e 2, foi realizada a dosagem de triglicerídeos nas amostras. Os resultados apontaram os valores de  $48\text{mg/dL}$  para a B1 no plasma e valor abaixo do limite de detecção no soro. Já para a B2, foram dosados  $176\text{ mg/dL}$  no plasma e  $40\text{ mg/dL}$  no soro. A presença de triglicerídeos elevados pode ter influenciado a obtenção de títulos fora da variação admitida na bolsa 2, visto que os testes não-treponêmicos de RPR detectam anticorpos anticardiolipínicos.

No teste rápido (treponêmico) foi observada a manutenção da reatividade de todas as amostras tratadas da B1, durante todo o período do estudo. No caso da B2, na 12ª semana de testagem e apenas na temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , observou-se o decaimento da reatividade das

alíquotas. Supõe-se que esse comportamento se deva à influência da temperatura alta, a qual não é recomendada para a conservação de amostras biológicas pois é adotada como temperatura ótima para reações enzimáticas e crescimento microbiano. No caso da bolsa 1, esse comportamento não foi observado no período de estudo.

Os resultados obtidos no teste treponêmico FTA-Abs, demonstraram que as amostras se mantiveram reativas até o final do estudo, conforme a figura 15. Isso demonstra a estabilidade dos anticorpos anti-*T. pallidum*, que mesmo sob diferentes condições de temperatura e de tratamento das amostras, se mantiveram reativos até 90 dias após o início da manipulação da alíquota. Diferente do observado para os testes rápidos, não foram observadas reduções na reatividade do teste FTA-Abs em nenhuma das temperaturas de armazenamento das amostras. Por motivos econômicos, o teste de quimiluminescência foi realizado apenas duas vezes (início e fim do período do estudo), e na décima segunda semana manteve a mesma reatividade da primeira semana.

De acordo com Abcam (2017), para prevenir contaminação microbiana em soluções contendo anticorpos para utilização *in vitro*, a azida de sódio pode ser adicionada em concentrações de 0,02%-0,05%. Em bulas provenientes de *kits* para sorologia, como a bula do RPR Wama, a concentração de azida de sódio utilizada nos controles é de 0,095%. No presente estudo foi adotada concentração de 0,1% de azida de sódio 1M, com a finalidade de evitar possíveis erros de pesagem devido ao pequeno volume utilizado.

Na Figura 29 podemos observar o aparecimento de fungos nas amostras de soro sem azida de sódio acondicionadas na temperatura de 30°C; esse fenômeno ocorreu nas duas bolsas e começou a ser detectado a partir da quinta semana do estudo, porém, não foi observado nas amostras de soro com azida de sódio. Isso confirma a utilidade da azida de sódio como conservante de soro e plasma sem alteração do padrão de reatividade da amostra, visto que a temperatura de 30°C é propícia para o crescimento de microrganismos. Foi observado a ausência de fungos nas amostras de plasma das bolsas 1 e 2 sem azida de sódio. Supõe-se que isso pode ter ocorrido devido a presença prévia de conservantes no plasma (CPDA-1), e que podem ter evitado o crescimento de fungos e bactérias nessa amostra. O processo de desfibrinação envolve muitas etapas com sedimentação e precipitação que removem diversos componentes da amostra, como observado na diferença da dosagem de triglicérides no plasma e no soro. Na desfibrinação os conservantes oriundos do plasma podem ter sido retirados.

Na figura 30 é possível verificar a presença de um coágulo nos tubos contendo plasma das duas bolsas utilizadas, esse fenômeno ocorreu nas amostras acondicionadas nas

temperaturas de 2-8°C e de -20°C descongeladas em temperatura ambiente, e foi observado a partir da sexta semana de testagem. Esses pequenos “coágulos” podem ser depósitos de fibrinas e são observados em plasma congelado e descongelado.

A já relatada influência da precipitação de fibrina em amostras de plasma congeladas as torna não recomendadas para a utilização em painéis de controle de qualidade. Além disso, no caso do diagnóstico sorológico da sífilis alguns métodos não admitem plasma como amostra. Essas limitações implicam grandemente em programas de garantia da qualidade de testes diagnósticos, uma vez que o plasma (proveniente de bolsas de sangue doadas) é o modo mais fácil obtenção de amostras reativas em grandes volumes. Neste estudo foi demonstrado que o processo de desfibrinação de plasma com trombina e cloreto de cálcio é totalmente eficiente resultando em completa coagulação da amostra, apresentado na Figura 3. Com a pequena modificação ao protocolo de Castro e colaboradores (2002) de adição de uma etapa extra de centrifugação ao final do processo, não há presença de cristais provenientes de resíduos de Kaolin nas amostras, que poderiam interferir na leitura dos resultados dos testes não-treponêmicos.

Dessa forma, recomenda-se a realização da desfibrinação, visto que no estudo não foram observadas diferenças nos resultados entre as amostras de plasma e soro após esse processo. A adição da azida de sódio é necessária para evitar o crescimento microbiano nas amostras.



## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como um dos objetivos induzir diferentes condições que podem existir em uma rotina de laboratório sobre amostras de plasma e amostras de plasma desfibrinado (soro) reagentes e não reagentes para sífilis, manipulando uma mesma alíquota durante 90 dias, retirando-a de uma determinada condição, utilizando-a, e devolvendo-a para seu local de armazenamento, totalizando 12 ciclos, um a cada semana. Foi possível observar que todas as amostras que mantiveram suas características originais foram armazenadas em temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , mesmo sendo manipuladas diversas vezes e sofrendo ciclos de congelamento e descongelamento, além de não terem sido observadas diferenças importantes entre os grupos (G1, G2, G3 e G4) das amostras.

A adição de azida de sódio como conservante nas amostras não resultou em diferenças nos resultados dos testes realizados, no entanto, sua utilização foi de extrema importância na prevenção do crescimento microbiano em amostras desfibrinadas, além disso, após o processo de desfibrinação, não foram observados cristais precipitados nas amostras.

O descongelamento em banho maria  $37^{\circ}\text{C}$  se enquadra como uma solução rápida para descongelar amostras, visto que nesse estudo não foram observadas diferenças entre essa forma de descongelar as alíquotas em comparação com o descongelamento em temperatura ambiente ( $20-26^{\circ}\text{C}$ ).

O comportamento dos anticorpos treponêmicos e não-treponêmicos apresentou-se diferente, no qual os anticorpos treponêmicos mantiveram-se reativos até o final do estudo e os anticorpos não-treponêmicos apresentaram variações nos títulos, demonstrando instabilidade. Dessa forma, deve-se estudar as características das bolsas de plasma antes de selecioná-las para produção de painéis de controle da qualidade, pois neste estudo observamos possível interferência de características intrínsecas das amostras na variabilidade dos títulos nos testes não-treponêmicos. Os dados deste estudo somados a uma caracterização eficiente das amostras selecionadas dão suporte para a produção de painéis de controle da qualidade confiáveis e estáveis.



## REFERÊNCIAS

- ABCAM. **Antibody Storage Guide**. Disponível em: <[http://www.abcam.com/tag/antibody guide](http://www.abcam.com/tag/antibody-guide)>. Acesso em: 20 mar. 2017
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. **Resolução RDC Nº 302, de 13 de Outubro de 2005**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 14 out. 2005. n. 198, Seção 1, p. 33-35. Disponível em: <<https://www.pncq.org.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2016
- AVELLEIRA, J. C. R.; BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, p. 111-126, 2006.
- BRASIL. CONITEC. Relatório de Recomendação: **Testes para diagnóstico da Sífilis**. 159. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 15 p. Disponível em: <[http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Relatorio\\_Testes-IST\\_final.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Relatorio_Testes-IST_final.pdf)>. Acesso em: 26 maio 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p. Disponível em: <[www.bvsmms.saude.gov.br](http://www.bvsmms.saude.gov.br)>. Acesso em: 13 jun 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sífilis: Estratégias para diagnóstico no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 100 p. Disponível em: <[www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)>. Acesso em: 13 jun 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Manual técnico para o Diagnóstico da Sífilis**. Brasília: DDAHV, 2015. Disponível em: <[www.saude.gov.br/consultapublica](http://www.saude.gov.br/consultapublica)>. Acesso em: 15 jun. 2016.
- BREY, Robin L. et al. Effects of Repeated Freeze-Thaw Cycles on Anticardiolipin Antibody Immunoreactivity. **Immunopathology**, San Antonio, v. 102, n. 5, p.586-588, nov. 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article/102/5/586/1755481/Effects-of-Repeated-Freeze-Thaw-Cycles-on>>. Acesso em: 26 maio 2017.
- CONTROL LAB. **Gestão da Fase Analítica do Laboratório: como assegurar a qualidade na prática**. Rio de Janeiro: Control Lab, 2011. 186 p. Disponível em: <[https://controllab.com/pdf/GestaoDaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL2\\_PDF.pdf](https://controllab.com/pdf/GestaoDaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL2_PDF.pdf)>. Acesso em: 29 maio 2017
- CASTRO, A. R. et al. Defibrination of blood plasma for use in serological tests for syphilis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1376-8, 2002.
- CASTRO, Arnold R.; JOST, Heather A.. Effect of Multiple Freeze and Thaw Cycles on the Sensitivity of IgG and IgM Immunoglobulins in the Sera of Patients With Syphilis. **Sexually Transmitted Diseases, Atlanta**, v. 40, n. 11, p.870-871, nov. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/olq.0000000000000036>
- FERGUSON, L. A.; VARNADO, J. W. Syphilis: an old enemy still lurks. **J Am Acad Nurse Pract**, v. 18, n. 2, p. 49-55, 2006.

KAUR, G.; KAUR, P. Syphilis testing in blood donors: an update. **Blood Transfus**, v. 13, n. 2, p. 197-204, 2015.

LARSEN, S. A. et al. **A manual of tests for syphilis**. Washington: APHA, 1998. 361 p.

MURPHY, Kenneth; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark. **Imunobiologia**: de Janeway. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 899 p.

NYATSANZA, F.; TIPPLE, C. Syphilis: presentations in general medicine. **Clin Med (Lond)**, v. 16, n. 2, p. 184-8, 2016.

OLIVEIRA, C.A.; MENDES, M. E. (Org). **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática**. 1. Ed., vol 1. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010.

PISCALHO, Inês Damasceno. **Relatório de Estágio**. 2014. 180 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Análises Clínicas, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014. Disponível em: <[http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/15892/1/Relatorio\\_Estagio\\_Ines.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/15892/1/Relatorio_Estagio_Ines.pdf)>. Acesso em: 26 maio 2017.

RIBEIRO, Álvaro da Silva. **Confecção de Painel Sorológico para Controle da Qualidade de Conjuntos de Diagnósticos para Detecção do Anti - HIV**. 2006. 47 f. Monografia (Especialização) - Curso de Pós - Graduação Lato Sensu em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós - Graduação Lato Sensu em Vigilância Sanitária Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/14186/1/1.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2016

ROTTA, Osmar. Diagnóstico sorológico da sífilis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo, v. 3, n. 80, p.299-302, abr. 2005.

RUDOLF-OLIVEIRA, Renata. **POP 001 Validação Lote a Lote dos TR de Sífilis: Produção de Painéis**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SANDLE, L. N. The management of external quality assurance. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 2, p. 141-4, 2005.

SANTA CATARINA. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Secretaria do Estado de Saúde. **Sífilis**. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/sifilis/>> Acesso em: 15 de jun. 2016.

UNITED STATES OF AMERICA. **Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015**. Atlanta: CDC, 2015. 64 v. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/tg2015/>>. Acesso em: 13 jun. 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines for organizing national external quality assessment schemes for HIV serological testing**. UNAIDS 96.5; 1996.

WANG, Wei et al. Antibody Structure, Instability, and Formulation. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**. Chesterfield, p. 1-26. jan. 2007.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
 COORDENADORIA DOS CURSOS DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
 Campus Universitário - Trindade - CEP: 88040-900 - Florianópolis - SC  
 Telefone: (48) 3721-9235 - e-mail: biologia@contato.ufsc.br  
 Site: www.cienciasbiologicas.ufsc.br

**BIO7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II**

**ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Semestre 2017/1

Aluno: Handhylla de Melo Machado  
 Número de matrícula: 13106531

Título do Trabalho: Avaliação dos efeitos da conversão do plasma sobre a reatividade e estabilidade de pontos serológicos para diagnóstico de Sfilis

Orientador(a): Marcia Luiza Bazzo  
 Co-Orientador(a):

Local de apresentação do trabalho: Sala de aula da Técnica Operatória - HU/UFSC

**Avaliação pela banca examinadora**

Presidente:	<u>Maria Luiza Bazzo</u>	Nota:	<u>10</u>
Membro Titular:	<u>Carlos Roberto Louetti</u>	Nota:	<u>10</u>
Membro Titular:	<u>Flávia Martinello</u>	Nota:	<u>10</u>
Membro Suplente:	<u>Joana Murara Waldner</u>	Nota:	<u>10</u>
Média Final:	<u>10 (100%)</u>		

A Banca examinadora solicitou as seguintes alterações no TCC: algumas sugestões de alterações e/ou correções formais e algumas alterações de consistências

de alterações e/ou correções formais e algumas alterações de consistências

Presidente da Banca: Joana Murara Waldner  
 Membro Titular: [Signature]  
 Membro Titular: [Signature]  
 Membro Suplente: [Signature]

Florianópolis, 30 de Junho de 2017