



Sífilis

ELISA recombinante v.4.0

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-*Treponema pallidum*

SIGNIFICADO CLÍNICO

A sífilis é uma doença venérea causada pelo *Treponema pallidum*, que possui a capacidade de invadir as mucosas íntimas ou a pele em áreas de abração. O contato sexual é a forma mais comum de transmissão. No entanto, pode-se transmitir através da barreira placentária da mãe ao feto, ou mediante transfusão sanguínea.

A detecção e tratamento da doença em seus estágios iniciais é fundamental afim de evitar complicações graves como a sífilis cardiovascular, a neurosífilis e a sífilis congênita.

O diagnóstico desta doença vê-se obstaculizado pela carência de um método para cultivar o microrganismo em meios de laboratório e a dificuldade para detectá-lo nos estágios da doença onde não se observam lesões epidérmicas.

O diagnóstico pode-se realizar:

- por métodos de detecção de anticorpos não-específicos (que utilizam antígenos não-treponêmicos) cuja interpretação é visual;
- por métodos imunoenzimáticos (ELISA) que detectam a presença de anticorpos específicos contra o *Treponema pallidum* em amostras de pacientes que se encontram em diferentes estágios da doença.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

As cubetas de policubeta estão recobertas com antígenos recombinantes da bactéria *Treponema pallidum* (p15, p17 e p47). A amostra diluída incuba-se nas cubetas. Se os anticorpos específicos encontram-se na amostra, estes ligam-se aos antígenos na cubeta. O material não ligado elimina-se por lavagem. No estágio seguinte acrescenta-se o conjugado (anticorpo monoclonal anti-IgG humana conjugado com peroxidase). Este liga-se aos complexos antígeno-anticorpo formados previamente. O conjugado não ligado elimina-se por lavagem. Logo após, acrescenta-se uma solução contendo tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. As amostras reativas desenvolvem cor azul clara que vira-se amarela quando acrescentar ácido sulfúrico para deter a reação.

REAGENTES FORNECIDOS

Policubeta sensibilizada: policubeta de tiras recortáveis com 96 cubetas recobertas com antígenos recombinantes de *Treponema pallidum*.

Diluinte de Amostra: tampão salino com tensoativo. Cor violeta.

Conjugado Concentrado: anticorpo monoclonal anti-IgG humana conjugado com peroxidase (10x). Cor vermelha.

Diluinte de Conjugado: tampão salino com proteínas.

Revelador: solução de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Tampão de Lavagem Concentrado: tampão salino com tensoativo (25x). Cor verde.

Controle Positivo: soro humano inativado contendo anticorpos anti-*Treponema pallidum*. Cor laranja.

Controle Negativo: soro humano não reativo, inativado. Cor amarela.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

Água destilada ou desionizada.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Micropipetas para medir os volumes indicados
- Ponteiras descartáveis
- Material volumétrico para preparar as diluições indicadas
- Estufa a 37°C
- Papel absorvente
- Luvas descartáveis
- Relógio alarme ou cronômetro
- Hipoclorito de sódio
- Sistema de lavagem de policubetas (manual ou automático)
- Espectrofotômetro para leitura de policubetas

PRECAUÇÕES

- Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como se fossem capazes de transmitir a infecção.
- Os soros controles foram examinados para antígeno de superfície de Hepatite B (HBsAg) e anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e da Hepatite C (HCV), encontrando-se não reativos. Porém, recomenda-se manipulá-los com as precauções requeridas para amostras potencialmente infecciosas.
- Todos os materiais utilizados no ensaio devem ser tratados a fim de assegurar a inativação de agentes patogênicos. O método recomendado para este procedimento é autoclavar durante 1 hora a 121°C. Os líquidos descartados podem ser desinfetados com hipoclorito de sódio, (concentração final de 5%) durante pelo menos 60 minutos.
- Não intercambiar reagentes de kits e lotes diferentes.
- Não utilizar reagentes de outra origem.
- Evitar o contato das paredes das cubetas com os ponteiras.
- Não utilizar elementos metálicos que possam entrar em contato com os reagentes.
- As policubetas devem ser incubadas em estufa. Evitar abrir a estufa durante a incubação. Não usar banho-maria.

- Evitar que vapores de hipoclorito provenientes dos recipientes de descarte biológicos ou outras formas entrem em contato com a policubeta, pois o hipoclorito afeta a reação.
- Evitar o contato do ácido sulfúrico (Stopper) com a pele e mucosas. R36/38: irrita os olhos e a pele. R34: provoca queimaduras. S24/25: evitar o contato com os olhos e a pele. S26: caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com abundante água e acudir ao médico. S28: caso de contato com a pele, lavar imediatamente com abundante água. S37/39: utilizar luvas adequadas e proteção apropriadas para os olhos/cara.
- Evitar o derrame de líquidos e a formação de aerossóis.
- Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis e proteção nos olhos durante a manipulação das amostras e reagentes do ensaio.
- Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme à regulação local vigente.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É importante que todo o material utilizado para a preparação dos reagentes, esteja limpo e livre de detergente e hipoclorito.

Tampão de Lavagem: a baixa temperatura os componentes do reagente concentrado podem precipitar. Neste caso, esquentar a solução a 37°C até a sua dissolução completa. Para a obtenção do tampão de lavagem pronto para uso, diluir uma parte do Tampão de Lavagem Concentrado (25x) com 24 partes de água destilada ou desionizada. Ex.: 20 ml com 480 ml para uma policubeta completa.

Conjugado: diluir uma parte de Conjugado Concentrado (10x) com 9 partes de Diluente de Conjugado (ex.: vide a tabela seguinte com volume necessário de Conjugado Concentrado e Diluente de Conjugado):

Nº de cubetas	Conjugado Concentrado	Diluente de Conjugado
8	100 ul	0,9 ml
16	200 ul	1,8 ml
24	300 ul	2,7 ml
32	400 ul	3,6 ml
96	1200 ul	10,8 ml

Diluente de Amostra, Diluente de Conjugado, Revelador, Stopper, Controle Positivo e Controle Negativo: prontos para uso.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Tampão de Lavagem Concentrado e Stopper: podem-se conservar a temperatura entre 2 e 25°C.

Tampão de Lavagem (1x): uma vez diluído, é estável 3 meses a temperatura ≤ 25°C.

Conjugado: uma vez diluído, é estável 6 horas a temperatura ≤ 25°C.

Policubeta sensibilizada: não abrir a embalagem até o momento de uso, e esperar atingir a temperatura ambiente, pois ao contrário se favorecerá a condensação de umidade na superfície das cubetas. As tiras de cubetas não utilizadas devem ser conservadas dentro do envelope com o dessecante, perfeitamente fechado e mantida entre 2-10°C. As tiras conservadas nestas condições podem-se utilizar nos 4 meses posteriores desde que não se ultrapasse a data de vencimento do kit.

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta da amostra: obter da maneira habitual.

b) Aditivos: não são necessários para soro. As amostras de plasma poderão ser coletadas com heparina, citrato ou EDTA como anticoagulante.

c) Substâncias interferentes conhecidas: não observam-se interferências por bilirrubina até 30 mg/dl, ácido ascórbico até 50 mg/dl, triglicérides até 1500 mg/dl ou hemoglobina até 300 mg/dl.

As amostras que contêm partículas, deverão-se clarificar por centrifugação.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve-se conservar sob refrigeração (2-10°C). Caso não se realizar o ensaio dentro das 72 horas, deve-se conservar a -20°C. Não é recomendável realizar vários ciclos de congelamento e descongelamento, desde que pode produzir resultados errôneos. Caso de utilizar amostras congeladas, devem-se homogeneizar e centrifugar antes de seu uso.

A inativação pelo calor pode alterar o resultado.

Não utilizar amostras com contaminação microbiana.

Caso as amostras devam-se transportar, embalar conforme as especificações legais referentes ao transporte de material infeccioso.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1- Levar os reagentes e as amostras a temperatura ambiente antes de iniciar a prova.

2- Preparar o volume necessário de Tampão de Lavagem diluído.

3- Colocar no suporte de tiras, o número de cubetas requeridas para a quantidade de determinações a realizar, incluindo 2 cubetas para o Controle Positivo (CP) e 3 para o Controle Negativo (CN).

4- Colocar o Diluente de Amostra, após a amostra (A) e os controles, segundo o seguinte esquema:

	A	CP	CN
Diluente de Amostra	100 ul	100 ul	100 ul
Controle Positivo	-	20 ul	-
Controle Negativo	-	-	20 ul
Amostra	20 ul	-	-

Homogeneizar por carga e descarga da micropipeta. Ao adicionar a amostra, o Diluente de Amostra mudará de cor, segundo a tabela seguinte:

Tipo de amostra	Sem amostra	Soro ou plasma	Controle Positivo	Controle Negativo
Cor	Violeta	Azul claro	Alaranjado escuro	Verde

Advertência: as amostras hemolisadas ou com turbidez, podem mudar a cor final sem alterar os resultados. A mudança da cor pode depender do volume de amostra acrescentado e da sua composição. Uma viragem da cor de menor intensidade pode-se dever a uma menor quantidade amostra, a que a mesma não esteja nas condições apropriadas, ou que tenha um nível baixo de proteínas.

5- Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com a fita auto-adesiva fornecida, e incubar 60 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Paralelamente, preparar o conjugado diluído (vide a tabela em PREPARAÇÃO DOS REAGENTES).

6- Após da incubação, eliminar completamente o líquido de cada cubeta. Lavar 5 vezes seguindo as instruções de lavagem (vide PROCEDIMENTO DE LAVAGEM).

7- Acrescentar o Conjugado:

Conjugado diluído	100 ul	100 ul	100 ul
--------------------------	--------	--------	--------

Para evitar a evaporação, cobrir a policubeta com fita auto-adesiva.

8- Incubar 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

9- Lavar 5 vezes segundo as instruções de lavagem.

10- Colocar o Revelador, transvasando a um recipiente limpo apenas o volume necessário de Revelador. Não voltar o Revelador remanescente ao frasco original. Evitar o contato do reagente com agentes oxidantes.

Revelador	100 ul	100 ul	100 ul
------------------	--------	--------	--------

11- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente ($18-25^\circ\text{C}$), ao abrigo da luz.

12- Acrescentar o Stopper:

Stopper	100 ul	100 ul	100 ul
----------------	--------	--------	--------

13- Ler a absorbância em espectrofotômetro em forma bicromática a $450/620-650$ nm ou 450 nm.

Nota: recomenda-se realizar sempre a leitura em forma bicromática. Caso a leitura for monocromática, realizar um branco de reagentes que deverá ser subtraído das leituras das amostras.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor da reação é estável durante 10 minutos, portanto os resultados devem-se observar dentro desse lapso.

PROCEDIMENTO DE LAVAGEM

Eliminar o líquido das cubetas por aspiração ou inversão.

As cubetas lavam-se com 300 ul de Tampão de Lavagem diluído. Assegurar-se que a altura alcançada ao encher as cubetas não cause desbordos. A solução de lavagem deve permanecer em contato com as cubetas entre 30 e 60 segundos.

Garanta-se que após da última lavagem não fique líquido residual. Realize-se um dobre aspirado para eliminar o excesso de tampão. Caso de persistir após este procedimento, inverter a policubeta acima do papel absorvente e batê-la várias vezes a fim evitar resultados errôneos.

Nota: o procedimento de lavagem é crítico para o resultado do ensaio. Se ficar tampão de lavagem nas cubetas ou se as mesmas não estão completamente cheias, obterão-se resultados errôneos. Não deve-se deixar que as cubetas se sequem durante o procedimento. As lavadoras automáticas devem-se enxaguar com água destilada ou desionizada ao final do dia para evitar obstruções pelas sais presentes no tampão de lavagem.

RESUMO DO PROCEDIMENTO

ESTÁGIO	PROCEDIMENTO	PRECAUÇÕES/OBSERVAÇÕES
Diluição	Preparação da solução de lavagem (1x)	Dissolução dos cristais de sais
Diluinte de Amostra	Acrescentar 100 ul de Diluinte de Amostra em cada cubeta	
Amostras	Acrescentar 20 ul de A, CP e CP	Observa-se mudança de cor quando acrescenta-se a amostra e os controles
Incubação	Cobrir as cubetas e incubar durante 60 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	Em estufa
Lavagem	Lavar cada cubeta com 300 ul de tampão de lavagem (5 vezes)	Tempo de contato da solução de lavagem entre 30 e 60 segundos. Eliminar completamente o líquido residual das cubetas
Diluição	Preparação do Conjugado (1x)	Durante a incubação com a amostra, diluir o Conjugado Concentrado (10x)
Conjugado	Acrescentar 100 ul de Conjugado diluído (1x)	
Incubação	Cobrir as cubetas e incubar durante 30 ± 2 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	Em estufa

Lavagem	Idem à lavagem anterior	
Revelado	Acrescentar 100 ul de Revelador	Transvasar o volume de Revelador a usar. Não pipetar do frasco original. Descartar o reagente remanescente. Evitar o contato com agentes oxidantes.
Incubação	Durante 30 ± 2 minutos entre 18-25°C	Mantém a policubeta ao abrigo da luz
Detenção	Acrescentar 100 ul de Stopper	
Leitura	Ler em espectrofotômetro	Ler dentro dos 10 minutos

CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DA CORRIDA

O ensaio é considerado válido se cumpridas simultaneamente as seguintes condições:

1- A média das densidades ópticas (D.O.) dos Controles Negativos deve ser menor ou igual a 0,100.

Exemplo:

Leitura 1 = 0,014; Leitura 2 = 0,018; Leitura 3 = 0,019

Média = (0,014 + 0,018 + 0,019) / 3 = 0,017

2- Eliminar qualquer Controle Negativo com D.O. maior a 0,100

3- Se eliminar algum Controle Negativo, voltar a calcular a média dos Controles Negativos. Um ensaio é válido se aceitam-se pelo menos dois dos Controles Negativos.

4- A média das D.O. dos Controles Positivos deve ser maior ou igual a 1,000.

Exemplo:

Leitura 1 = 1,697; Leitura 2 = 1,774

Média = (1,697 + 1,774) / 2 = 1,736

5- A diferença entre a média das D.O. dos Controles Positivos e Controles Negativos deve ser maior ou igual a 0,900.

Se uma destas condições não se cumprirem, repetir o ensaio. Lembrar que as leituras obtidas dependerão da sensibilidade do analisador utilizado.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

a) Com instrumental óptico

A presença ou ausência de anticorpos anti-*Treponema pallidum* é determinada relacionando a absorbância da amostra com o valor do Cut-off.

Cut-off = CN + 0,160

CN: média das D.O. do Controle Negativo

Exemplo: 0,017 + 0,160 = 0,177

Amostras Não Reativas: consideram-se aquelas com absorbâncias menores ao valor Cut-off.

Amostras Reativas: consideram-se aquelas com absorbâncias maiores ou iguais ao valor Cut-off.

b) Interpretação visual

No caso de optar por este tipo de interpretação, deve-se considerar Não Reativa toda amostra que não apresentar uma coloração mais forte do que dos Controles Negativos. Pelo contrário, uma amostra netamente amarela considera-se Reativa.

Toda amostra inicialmente reativa, deve-se repetir em dupli-

cata. Se uma ou ambas duplicatas foram reativas, a amostra deverá se considerar reativa.

Uma amostra inicialmente reativa pode ser não reativa em ambas duplicatas. Isto pode-se dever a:

- Contaminação cruzada de uma cubeta não reativa por uma amostra reativa.

- Contaminação da amostra durante a dispensação, imprecisão no dispensado da amostra, Conjugado e/ou Revelador na cubeta.

- Reutilização de ponteiras.

- Contaminação da cubeta com hipoclorito ou outros agentes oxidantes.

Em certos casos uma amostra não reativa pode apresentar uma reação falsamente reativa no ensaio inicial, assim como na suas repetições. Algumas das causas deste fenômeno podem ser:

- Contaminação da amostra durante a sua extração, processamento ou conservação.

- Presença de substâncias interferentes, como auto-anticorpos, fármacos, etc.

- Dispensado e/ou aspirado ineficiente da solução de lavagem (sistema obstruído).

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

- Não utilizar pool de amostras.

- Não utilizar outros fluidos corporais como a saliva, líquido cefalorraquidiano ou urina.

- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição ou infecção pelo *Treponema pallidum*.

- Os resultados repetidamente reativos devem-se corroborar por um método confirmatório, conforme à normativa legal vigente.

- Não utilizar amostras inativadas pelo calor já que podem obter-se resultados falsos positivos.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

a) Sensibilidade

Sensibilidade clínica em Painéis de Performance

Em um estudo realizado com diferentes painéis comerciais internacionais, obtiveram-se os seguintes resultados:

- Syphilis mixed Titer Performance Panel (PSS 201), Boston Bio-medica, Inc.: detectaram-se 22 de 22 amostras positivas.

- Syphilis mixed Titer Performance Panel (PSS 202), Boston Bio-medica, Inc.: detectaram-se 18 de 18 amostras positivas.

- Syphilis Qualification Panel (QSS 701), Boston Biomedica, Inc.: detectaram-se 5 de 5 amostras positivas.
- Painel WO2 dos Centers for Disease Control (CDC), detectaram-se 20 de 20 amostras positivas.
- Painel de Performance para Sífilis, Q Panel, Brasil (PP0406): detectaram-se 16 de 16 amostras positivas.
- Painel de Performance para Sífilis, Q Panel, Brasil (PP0407): detectaram-se 16 de 16 amostras positivas.

b) Especificidade

Em um estudo realizado com 3519 amostras de soros e plasmas de diferentes centros de saúde, obteve-se uma especificidade de 99,85%.

Com um painel de 461 plasmas provenientes de uma população de alta prevalência, a especificidade obtida foi de 100%. Estudou-se a possível presença de reatividades cruzadas ensaiando amostras provenientes de 169 indivíduos com diferentes condições clínicas que podem ser causa de reações inespecíficas para o teste Sífilis ELISA recombinante v.4.0. Estas condições incluem pacientes com doenças auto-ímmunes ou doenças infecciosas diferentes a sífilis (HIV, HTLV, hepatite C, hepatite B, Chagas, outras). Para esta população, a especificidade foi de 99,4%.

c) Precisão

Avaliou-se a precisão do teste, seguindo o protocolo EP5-A recomendado pela NCCLS. Os ensaios foram realizados com amostras de diferentes níveis de reatividade e com os controles. Realizaram-se 2 ensaios diários, analisando cada amostra por duplicata durante 20 dias.

	Média (D.O.)	Intra-ensaio		Total	
		D.P.	C.V.	D.P.	C.V.
Amostra 1	0,716	0,082	11,440%	0,137	19,129%
Amostra 2	0,829	0,057	6,876%	0,083	10,013%
Amostra 3	0,389	0,031	8,020%	0,044	11,311%
Amostra 4	1,403	0,104	7,430%	0,154	10,976%
Controle(+)	1,585	0,084	5,290%	0,127	8,013%
Controle(-)	0,014	0,003	19,710%	0,002	12,143%

n = 80

APRESENTAÇÃO

Kit para 96 determinações (Cód. 1723452).

Kit para 192 determinações (Cód. 1723552).

REFERÊNCIAS

- Brown, D.L. et al. - American Family Physician 68/2:283-290, 2003.
- Morse, S.A. - Current Opinions in Infectious Diseases 14:45-51, 2001.
- Quattordio, L.E. et al. - Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 38/3:301-306, 2004.
- Singh, A.E. et al. - Clinical Microbiology Reviews 12/2:187-209, 1999.
- Young, H. - Sex Transm. Inf. 76:403-405, 2000.
- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A 19/2 (1999) National

Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Specifications for Immunological Testing for Infectious Diseases. Approved Guideline I/LA18-A2 (1994) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Clinical Evaluation of Immunoassays. Approved Guideline I/LA21-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Interference testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline EP7-A (2002) National Committee for Clinical Laboratory Standards.

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS

Policubeta **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

Diluyente **Muestra**

Diluyente de Amostra

Conjugado **Conc.**

Conjugado Concentrado

Conjugado **Diluy.**

Diluyente de Conjugado

Revelador

Revelador

Buf. Lavado **Conc.**

Tampão de Lavagem Concentrado

Control **+**

Controle Positivo


Control **-**

Controle Negativo

Stopper


Stopper

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

 Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"


 Representante autorizado na Comunidade Europeia

 Uso médico-diagnóstico "in vitro"

 Conteúdo suficiente para <n> testes

 Data de validade

 Limite de temperatura (conservar a)


 Não congelar

 Risco biológico


 Volume após da reconstituição

 Conteúdo


 Número de lote


 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante

 Consultar as instruções de uso

 Calibrador

 Controle

 Controle Positivo

 Controle Negativo

 Número de catálogo



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina