

Elaine Antunes de Lemos

Industrialização e avaliação do método de
Western blotting - **WB Tp-IgG** - como
confirmatório na sorologia da sífilis

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira

SÃO PAULO

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lemos, Elaine Antunes de

Industrialização e avaliação do método de *Western blotting* – WB Tp-IgG – como confirmatório na sorologia da sífilis / Elaine Antunes de Lemos. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Antonio Walter Ferreira.

Descritores: 1.*Western blotting* 2.Sífilis/diagnóstico 3.Serologia/métodos 4.Biotecnologia 5.Algoritmos 6.Kit de reagentes para diagnóstico

USP/FM/SBD-216/07

***Valeu a pena? Tudo vale a pena
se a alma não é pequena.
Quem quere passar além do Bojador
tem que passar além da dor.
Deus, ao mar o perigo e o abysmo deu
mas nelle é que espalhou o céu.***

Fernando Pessoa

À Deus

A minha família, Sergio Limão, Cauê e Theo,

Por tantas travessias que vivemos juntos.

Minhas maiores riquezas e motivo de muita felicidade. Pelo amor, apoio, paciência e compreensão.

Aos meus pais, Hiram e Janete,

Pela dedicação, amor, incentivo. Por sempre estarem presentes, nas horas em que tive que me ausentar.

Ao querido mestre, Antônio Walter Ferreira,

Por sua sabedoria, paciência, gentileza, orientação. Seu exemplo de determinação e trabalho. Por sua confiança, estímulo, apoio, amizade e por ajudar a ultrapassar os obstáculos enfrentados durante essa jornada.

OS MEUS AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e doadores que voluntariamente participaram deste trabalho.

Os diferentes grupos de pesquisa e serviços que acreditaram na importância do projeto e confiaram em sua execução e seriedade.

Aos pesquisadores Prof. Dr. José Eduardo Brandão Campos, Prof. Dr. Esper Kallas, Dr. Amadeo Saez-Alquezar que entenderam, confiaram, incentivaram e participaram da execução deste trabalho.

A todos os funcionários e grupos de pesquisa do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pelo incentivo, colaboração e acolhimento durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos colegas e a bioMérieux pela participação nas muitas etapas deste projeto, que sempre incentivaram minha formação.

Membros da banca de Qualificação Dra. Adelaide José Vaz, Dra. Edna Maria Albuquerque Diniz e Dra. Sandra do Lago Moraes-Ávila, pela orientação criteriosa e sugestões para a conclusão do projeto.

Minhas queridas irmãs de alma Kelly Aparecida Kanunfre, Sandra Beck, Maria Emília Germani Moura, Cristina Pisanheschi Azevedo. Presentes que Deus vai nos dando no decorrer da vida.

Dra. Maria Carmem Arroyo Sanchez, Dra. Guita Rubinsky Elefant, pelo apoio, amizade e carinho.

Clara A. Felix, que surgiu de última hora, mas foi essencial nos momentos de muito trabalho, principalmente nas nossas, muitas, sextas-feiras.

Fabiana Maria de Souza Leoratti, Sarita P Gobbo, obrigada pelo apoio, amizade e carinho.

Dr. Paulo Cotrim, Dra. Hiro Goto, Dr. Ângelo Lindoso e a todos os colegas do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Edite, Edna (quantas palavras amigas), Beatriz, Prianti, Fabrício, Priscila, Érica, Melissa, pela troca de informações, pela convivência, amizade e os ótimos momentos de descontração.

Minha querida irmã Luciane que soube ouvir inúmeras vezes, incontáveis choros, que me ensina e mostra o outro lado da vida, beijos..., e também para o Alexandre que dedicou seu carinho, tempo e valiosa atenção.

Meu irmão Ivan e sua família maravilhosa Márcia, Juan (meu primogênito), Pietra e Sofia, que fazem meus dias mais lindos e feliz.

Todas as minhas colegas de laboratório, Mônica, Juliana, Renata, Amanda, Lílian, Patrícia, Caroline, Camila, Cíntia, Lilia e Mayne pela convivência e amizade.

Todos aqueles que direta ou indiretamente, colaboraram na execução desta tese, a minha eterna gratidão.

Muito Obrigada

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita.” - Mahatma Gandhi.

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. | Aspectos epidemiológicos..... | 4 |
| 1.2. | Agente etiológico..... | 7 |
| 1.2.1. | Antígenos imunodominantes de <i>Treponema pallidum</i> | 9 |
| 1.3. | Patogenia | 12 |
| 1.4. | Fases clínicas da sífilis | 16 |
| | Sífilis primária..... | 16 |
| | Sífilis secundária | 17 |
| | Sífilis latente (recente e tardia)..... | 18 |
| | Sífilis terciária ou tardia..... | 18 |
| | Neurossífilis..... | 19 |
| 1.5. | Sífilis congênita | 19 |
| | Sífilis congênita precoce | 21 |
| | Sífilis congênita tardia..... | 21 |
| 1.6. | Diagnóstico de laboratório da sífilis..... | 22 |
| | Métodos diretos..... | 22 |
| | Métodos indiretos..... | 24 |
| 1.7. | Justificativa | 31 |
| 2. | OBJETIVOS | 33 |
| 3. | MÉTODOS | 35 |
| 3.1. | Casuística | 36 |
| 3.2. | Caracterização sorológica das amostras de soros..... | 38 |
| 3.3. | Aspectos éticos da pesquisa..... | 40 |
| 3.4. | Industrialização das etapas do processo de fabricação do <i>Western blotting</i> (WB) com antígenos de <i>Treponema pallidum</i> (Tp) utilizado na pesquisa de imunoglobulinas da classe G (IgG) - WB Tp-IgG | 41 |
| 3.4.1. | Obtenção e manutenção de <i>Treponema pallidum</i> | 42 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.2. | Obtenção de componentes antigênicos de <i>Treponema pallidum</i> | 44 |
| 3.4.3. | Controle de qualidade do extrato antigênico de <i>Treponema pallidum</i> | 45 |
| | Dosagem protéica | 45 |
| | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE | 45 |
| | <i>Western blotting</i> | 46 |
| 3.4.4. | Industrialização do SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> | 47 |
| | SDS-PAGE | 47 |
| | <i>Western blotting</i> | 51 |
| | Controle de qualidade das fitas de nitrocelulose sensibilizadas com extrato antigênico de <i>Treponema pallidum</i> | 54 |
| 3.4.5. | Preparo dos reativos complementares para composição do reagente WB Tp-IgG | 55 |
| | Conjugado imunoenzimático – Reativo R2 | 55 |
| | Diluyente de amostras de soros – Reativo R3 | 56 |
| | Soros controle negativo e positivo - Reativos R4 e R5. | 57 |
| | Solução cromogênica – Reativos R6 e R7 | 58 |
| | Solução de lavagem – Reativo R8. | 58 |
| 3.5. | Desenvolvimento do reagente WB Tp-IgG na forma de um kit diagnóstico. | 59 |
| 3.5.1. | Instruções para o uso e interpretação dos resultados do WB Tp-IgG | 60 |
| 3.5.2. | Preparo do kit WB Tp-IgG | 61 |
| 3.5.3. | Controle global do kit WB Tp-IgG | 61 |
| 3.5.4. | Controle de estabilidade do kit WB Tp-IgG | 61 |
| 3.6. | Análise estatística | 62 |
| 4. | RESULTADOS | 63 |
| 4.1. | Industrialização do WB Tp-IgG | 64 |
| 4.1.1. | Controle de qualidade do extrato antigênico de <i>Treponema pallidum</i> . | 64 |
| 4.1.2. | Controle de qualidade das fases de industrialização do SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> | 66 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.1.3. | Controle de qualidade dos reativos complementares para composição do reagente WB Tp-IgG | 68 |
| | Conjugado imunoenzimático – Reativo R2 | 68 |
| | Diluyente de amostras de soros – Reativo R3..... | 69 |
| | Soros controle negativo e positivo - Reativos R4 e R5. | 70 |
| | Solução cromogênica – Reativos R6 e R7..... | 71 |
| | Solução de lavagem – Reativo R8..... | 71 |
| 4.1.4. | Desenvolvimento do reagente WB Tp-IgG | 72 |
| | Controle global do kit WB Tp-IgG | 73 |
| | Controle da estabilidade do kit WB Tp-IgG | 73 |
| 4.2. | Aplicação do WB Tp-IgG | 75 |
| | Soros de gestantes atendidas durante o pré-natal no Hospital Universitário Gaffrè e Guinle (UNI-RIO) e na Maternidade Pro-Matre (SUS), da cidade do Rio de Janeiro..... | 75 |
| | Soros de pacientes recém infectados com o vírus da imunodeficiência humana | 78 |
| | Soros de banco de sangue com resultados reagentes ou inconclusivos na sorologia convencional para sífilis | 81 |
| | Soros de laboratório clínico com resultados reagentes ou inconclusivos nos testes de RPR e ELISA..... | 84 |
| 4.3. | Proposição de um de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis..... | 86 |
| 5. | DISCUSSÃO | 89 |
| 6. | CONCLUSÃO | 103 |
| 7. | ANEXOS | 105 |
| | A Critérios para definição de sífilis congênita | 106 |
| | B Aprovações das Comissões de Éticas envolvidas na tese de doutorado..... | 108 |
| | C Fluxograma de industrialização do WB Tp-IgG | 116 |
| | D Seqüência de fabricação do extrato Tp-ZW foi descrita em um fluxograma..... | 117 |
| | E Procedimentos de execução do teste WB Tp-IgG , “BULA”. | 118 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| F | Etapas do processo de produção do kit WB TP-IgG | 121 |
| G | Amostras de soros do grupo G3 – Soros de pacientes recém- infectados com o vírus HIV, com resultados positivos ou duvidosos nos testes treponêmicos e não-treponêmicos | 122 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 123 |
| 9. | APÊNDICE | |

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--|
| 4CN | 4-cloro α -naftol |
| AIDS | “Acquired Immunodeficiency syndrome” |
| ANVISA | Agência de Vigilância Sanitária |
| bp | Pares de bases |
| CDC | “Center for Disease Control and Prevention” |
| CQ | Controle de Qualidade |
| DSTs | Doenças sexualmente transmissíveis |
| EDTA | ácido etileno diamino tetracético |
| ELISA | “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ensaio imunoenzimático) |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FPB | Falso Positivo Biológico |
| FTA-abs | Fluorescent Treponemal Antibody – absorption |
| HATP | Hemaglutinação indireta para pesquisa de <i>Treponema pallidum</i> |
| HIV | vírus da imunodeficiência humana |
| HSH | Homem que fazem sexo com homem |
| HTLV-1 | “Human T-cell lymphotropic vírus” |
| IFD | Imunofluorescência direta |
| IFD-Tp | Imunofluorescência direta para pesquisa de <i>Treponema pallidum</i> |
| IFI | Imunofluorescência Indireta |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IgG | Imunoglobulina de classe G |
| IgM | Imunoglobulina de classe M |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| LES | Lupus Eritematoso Sistêmico |
| ME | mercaptoetanol |

| | |
|-------------------|--|
| MHA-TP | Microhemaglutinação para pesquisa de anticorpos anti <i>Treponema pallidum</i> |
| Mr | Massa molecular relativa |
| MS | Ministério da Saúde |
| NCR | Nacional Council Research |
| NR | Não Reagente |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ORFs | “Open Read Frames“ |
| PBS | “Phosphate Buffer Saline” – solução salina tamponada com fosfato |
| PBS | Solução Salina Tamponada de fosfatos |
| PBS-Tw | PBS contendo Tween 20 0,05% |
| PCR | “Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase) |
| PMSF | fluoreto de fenilmetilsulfonila |
| R | Reagente |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RIT | Rabbit Infectivity Test – Teste de infectividade em testículos de coelhos |
| RPR | Rapid Plasma Reagin |
| <i>Scaling up</i> | Processo da pesquisa para a produção |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| SNC | Soro Normal de Coelho |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| Th1 | Linfócito T helper 1 |
| Th2 | Linfócito T helper 2 |
| TLR | “Toll like receptors” |
| TNF- α | fator de necrose tumoral alfa |
| TPHA | <i>Treponema pallidum</i> hemagglutination |
| TPI | <i>Treponema pallidum</i> imobilization |

| | |
|-----------|---|
| TpN | <i>Treponema pallidum</i> , cepa Nichols |
| Tp-Zw | Extrato antigênico de <i>Treponema pallidum</i> tratado com Zwittergent® |
| TSB | Caldo nutriente de tioglicolato e soja |
| VDRL | Veneral Disease Research Laboratories |
| VPN | Valor Preditivo Negativo |
| VPP | Valor preditivo positivo |
| WB | <i>Western blotting</i> |
| WB Tp-IgG | <i>Western blotting</i> (WB) com antígenos de <i>Treponema pallidum</i> (Tp) utilizado na pesquisa de imunoglobulinas da classe G (IgG) |
| WHO | World Health Organization |
| Zw | Zwittergent® |

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| µg | micrograma |
| µL | microlitro |
| nm | nanômetro |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| kDa | kiloDalton |
| M | molar |
| mg | miligrama |
| mL | mililitro |
| mM | milimolar |
| mm | milimetro |
| ng | nanograma |
| rpm | Rotações por minuto |
| V | Volts |

TABELAS

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Adaptação de Norris, e <i>Treponema pallidum</i> “Polypeptide Research Group”, 1993, importantes polipeptídeos no imunodiagnóstico da sífilis, outras designações e propriedades..... | 10 |
| 2 | Etapas da fabricação do reagente WB Tp-IgG | 68 |
| 3 | Titulação seriada das 175 amostras de soros de gestantes, por VDRL..... | 75 |
| 4 | Resultados dos testes de TPHA, ELISA e a distribuição dos títulos por VDRL, em 175 amostras de soros de gestantes. | 76 |
| 5 | Resultados dos testes de TPHA, ELISA, WB Tp-IgG e a distribuição dos títulos por VDRL, com 175 amostras de soros de gestantes..... | 77 |
| 6 | Resultados das 156 amostras de soros de pacientes recém infectados com HIV, para os testes de VDRL, TPHA, FTA-abs. | 78 |
| 7 | Resultados das 156 amostras de soros de pacientes recém infectados com HIV, para os testes de VDRL, TPHA, FTA-abs e WB Tp-IgG | 79 |
| 8 | Resultados das 156 amostras de soro nos testes sorológicos de VDRL, ELISA, TPHA, FTA-abs e WB Tp-IgG | 80 |
| 9 | Resultados da triagem de doadores de sangue por ELISA e VDRL..... | 82 |
| 10 | Resultados dos testes de VDRL, ELISA _{1 e 2} , FTA-abs, TPHA e WB Tp-IgG , em 52 amostras de soros triadas como reagentes para sorologia da sífilis em banco de sangue | 82 |
| 11 | Análise combinada das 2990 amostras de soros nos testes sorológicos de VDRL, TPHA, ELISA ₂ e WB Tp-IgG | 83 |
| 12 | Parâmetros sorológicos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VP+) e negativos (VP-), ao se avaliar 2990 amostras de soros nos testes de ELISA ₂ , FTA-abs e TPHA, utilizando o WB Tp-IgG como referência..... | 84 |
| 13 | Resultados obtidos ELISA em 67 amostras de soros reagentes para sorologia da sífilis em laboratório de análises clínicas e avaliadas por RPR | 85 |
| 14 | Resultados dos testes de ELISA, RPR e WB Tp-IgG avaliados com 67 amostras de soros de pacientes encaminhados para sorologia da sífilis..... | 85 |

FIGURAS

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Padrão de corrida eletroforética do extrato antigênico de <i>T.pallidum</i> após extração com detergente Zwittergent (<i>Tp-ZW</i>). <i>Tp-ZW</i> a - extrato em controle de qualidade, <i>Tp-ZW</i> b – extrato referência e Pd MM - Padrão de Massa Molecular (<i>Full range rainbow, Amershan</i>) 65 | 65 |
| 2 | Perfil de reatividade do extrato antigênico de <i>T.pallidum</i> (<i>TP-ZW</i>) por WB na presença de amostra de soro padrão positivo para sífilis e Pd MM - Padrão de Massa Molecular (<i>Full range rainbow, Amershan</i>)..... 65 | 65 |
| 3 | Homogeneidade da membrana com fitas A, B, C, D, E e F, avaliadas com soro padrão positivo diluído a 1/100 e membrana referência..... 67 | 67 |
| 4 | Titulação do conjugado enzimático anti-IgG humana marcada com peroxidase, para definição do título de uso com amostras de soros padrão reagentes e não reagentes por Wb Tp-IgG 69 | 69 |
| 5 | Perfil de reatividade de amostras de soros controle negativo R4 e positivo R5, preparados para o kit WB Tp-IgG, ensaiado com fita referência e teste. 70 | 70 |
| 6 | Protótipo do reagente WB Tp-IgG formatado para ser utilizado em avaliações internas e externas. 73 | 73 |
| 7 | Resultados da estabilidade quando se avaliou o reagente por 7 e 15 dias em Estufa 37°C em comparação ao produto conservado em geladeira e reagente referência. 74 | 74 |
| 8 | Sugestão de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis, partindo de seleção com método treponêmico..... 87 | 87 |
| 9 | Sugestão de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis partindo de seleção com método não-treponêmico..... 88 | 88 |

QUADRO

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Composição do Kit WB Tp-IgG 72 | 72 |
|---|--|----|

RESUMO

Lemos EA. *Industrialização e avaliação do método de Western blotting - WB Tp-IgG - como confirmatório na sorologia da sífilis* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 134 p.

A sífilis adquirida e a congênita continuam aumentando e preocupando as autoridades sanitárias do mundo, ao verem que as metas estabelecidas para o seu controle estão longe de serem atingidas. Apesar dos esforços feitos na descoberta de novas ferramentas para o diagnóstico e monitoramento da sífilis, vemos um despreparo muito grande, principalmente entre os laboratoristas, em processar corretamente os reagentes disponíveis e melhor selecionar aqueles que apresentem qualidade para serem usados na rotina do laboratório. O que constatamos neste estudo é um espelho da realidade do diagnóstico da sífilis e mostra a dificuldade que os clínicos enfrentam ao receberem um laudo do laboratório. Trabalhando em colaboração com diferentes serviços e grupos de pesquisa, selecionamos aqueles que trabalhavam com: gestantes atendidas no pré-natal, doadores de sangue, pacientes infectados pelo HIV e pacientes de laboratório clínico e fizemos um estudo crítico da sorologia utilizada em cada serviço. Verificamos discrepância dos resultados obtidos nos testes não-treponêmicos VDRL e RPR, principalmente entre os soros de baixa reatividade, e nos treponêmicos FTA-abs, TPHA e ELISA. Decidimos aplicar o método de *Western blotting* e analisar o seu comportamento em todas as amostras de soros ensaiadas. Para obtenção de resultados reprodutíveis, fizemos a industrialização do método e formatamos um reagente na forma de um kit diagnóstico, **WB Tp-IgG**, que pudesse ser facilmente utilizado e interpretado. Os resultados obtidos mostraram que o **WB Tp-IgG** pode ser utilizado como método confirmatório da sífilis, substituindo o FTA-abs, tradicionalmente recomendado para essa finalidade e que pudesse fazer parte de uma proposta de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis.

Descritores: 1. *Western blotting* 2. Sífilis/diagnóstico 3. Sorologia/métodos 4. Biotecnologia 5. Algoritmos 6. Kit de reagentes para diagnóstico

SUMMARY

Lemos EA. *Industrialization and evaluation of Western blotting method - WB Tp-IgG - as confirmatory for syphilis serology* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 134 p.

Acquired and congenital syphilis have been increased and worried the worldwide health authorities, mainly because the WHO targets for syphilis control are far from to be held. Much effort had been made for development of new tools to be used in syphilis diagnosis and following up, however we noticed a lack of ability of laboratory workers in the correctly choosing and using the reagents in laboratory routine. In this study what we observed were the reality of syphilis diagnosis and the difficulties that physicians have in how to procedure when they received the results from the laboratory. Working in collaboration with different settings and research groups we choose some of them that attend pregnant women, blood donors, HIV patients and patients from clinical laboratory. With these group individuals we made a critical study of the serology methods used in each one. We verified high level of discordant results between nontreponemal tests VDRL and RPR, mainly in serum samples with low reactivity and between treponemal tests FTA-abs, TPHA and ELISA, in all services. To obtain reproducibility of the results we made the industrialization of the method and set up a reagent as a kit diagnosis, easily to performer. Applying the *western blotting* method we evaluated the performance of the test in all sera samples assayed. The results showed that the **WB Tp-IgG** can be useful as confirmatory test for syphilis, replacing FTA-abs, traditionally recommended for this and that could be included in algorithm propose for serological diagnosis of syphilis.

Descriptors: 1. *Western blotting* 2. Syphilis/diagnosis 3. Serology/methods 4. Biotechnology 5. Algorithms 6. Reagent kits diagnostic

1. INTRODUÇÃO

Sífilis, doença infecciosa crônica tem acometido o mundo durante séculos constituindo-se ainda hoje um problema de saúde pública, é transmitida normalmente por contato sexual, de mãe para filho e ocasionalmente por transfusão de sangue e derivados.

Existem poucas explicações para a não erradicação da patologia, uma vez que testes sensíveis e baratos foram desenvolvidos para o diagnóstico e monitoramento de casos, pouca ou nenhuma resistência ao antibiótico convencional foi detectada e o patógeno é incapaz de se adaptar a reservatórios animais.

Por ser uma doença social, atinge principalmente grupos populacionais marginalizados tendo na miséria e ignorância seus maiores difusores.

Foi estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que 12 milhões de novos casos de sífilis ocorrem todo o ano, 90% dos quais em países em desenvolvimento (WHO/HIV AIDS/2001.02) e outras 50 milhões de pessoas necessitam de tratamento e acompanhamento.

A doença tem duração prolongada, quando não tratada, com pequena proporção de mortes/ano, devido a complicações neurológicas ou cardiovasculares. Entretanto, a morbidade não inclui somente o impacto da doença, mas é amplificada em consequência de sua transmissão vertical e por contribuir sinergicamente para o risco de se adquirir a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (Peeling e Hook, 2006).

A sífilis na adolescência tem aumentado significativamente nos países em desenvolvimento o que contribui na elevação dos índices da doença congênita. Crianças e adolescentes grávidas dificilmente têm acesso à rede

hospitalar o que limita o diagnóstico e a prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs).

Para países em desenvolvimento a OMS possui um programa que tem entre suas prioridades implementar a triagem e o tratamento da sífilis em mulheres grávidas, com o intuito de minimizar a doença congênita e suas conseqüências. No entanto, entende-se que o sucesso desse programa depende da descentralização dos serviços de triagem em centros de saúde de atendimento primário, possibilitando a mulher, em uma única visita, receber avaliação clínica e laboratorial e se necessário o tratamento. Um modelo de descentralização realizado com sucesso no Haiti, com colaboração de organismos não governamentais, reduziu em 75% a incidência de doença congênita, depois de dois anos (Fitzgerald, et al., 2003). Uma das oito “Metas para o Desenvolvimento do Milênio” (Millennium Development Goals) proposta para serem alcançadas até 2015, tem como objetivo a redução em 2/3 de mortalidade infantil entre crianças menores de cinco anos. Essa meta pode ser atingida se forem introduzidos ao programa de triagem e tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), serviços de prevenção de doenças sexualmente transmissíveis, da tuberculose e o planejamento familiar. Os custos dessa adição seriam pequenos e os benefícios imensuráveis (Travis, et al., 2004).

O Ministério da Saúde do Brasil (MS) é signatário de acordo internacional que busca controlar e erradicar a sífilis, principalmente a congênita. Para isso deve-se observar a correta forma de tratamento dos pacientes, a plena integração de atividades de controle e prevenção com

outros programas de saúde, o desenvolvimento de sistemas de vigilância locais ativos e a interrupção da cadeia de transmissão (diagnóstico e tratamento adequados). Outro ponto de vigilância é o aconselhamento e orientação de pacientes com DSTs, nesse sentido o MS vem implantando a “abordagem sindrômica” aos pacientes, visando aumentar a sensibilidade no diagnóstico e tratamento dessas doenças, o que resultará em maior impacto na redução das mesmas (SVS/MS, 2005).

Estudos epidemiológicos mostraram que a história das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) está associada com o aumento de 3 a 5 vezes do risco de se contrair o vírus do HIV, tanto entre homossexuais como heterossexuais, o que pode ser atribuído aos hábitos sexuais dessas populações e principalmente à presença de úlceras genitais e inflamações (Bolan, 1998). A interação sífilis-HIV pode causar a aceleração da história natural de cada infecção. A sífilis no paciente HIV pode apresentar-se com alterações de manifestações clínicas, laboratoriais, risco de complicações, diminuição da resposta à terapia, necessidade de alterações de dosagem ou duração de tratamentos requeridos para a cura da doença (Lynn e Lightman, 2004).

1.1. Aspectos epidemiológicos

Nos Estados Unidos, o programa nacional para controle e eliminação da sífilis, iniciado nos anos 90 reduziu os índices da infecção aos mais baixos níveis, chegando-se a prevalência de cinco (5) indivíduos infectados

a cada 100.000 habitantes (CDC, 2002). No entanto, esse quadro tem mudado, com recrudescimento da sífilis em países desenvolvidos como Irlanda, Alemanha e cidades americanas, de San Francisco e Los Angeles, em grupos com comportamento de risco, como homens que fazem sexo com homens (HSH) e profissionais do sexo (Hopkins, et al., 2004; Marcus, et al., 2005, Dilley, et al., 2004). Nos EUA, em 2004 houve aumento de 11,2% dos casos de sífilis primária que passaram de 7.177 em 2003 para 7980 (CDC, 2004).

Em países que passaram por fortes mudanças sociais, tais como a Rússia e o leste Europeu, o ressurgimento da sífilis alcançou proporções epidêmicas com níveis em 1996 que excederam os 900 casos para cada 100.000 habitantes, entre homens e mulheres com idade entre 20 e 29 anos, contribuindo para o agravamento no desenvolvimento de epidemias de HIV (Tichonova, et al., 1997). Na América do Norte e Oeste Europeu, a epidemiologia da sífilis mudou, tornando-se desproporcionalmente comum entre minorias populacionais, como homossexuais e usuários de drogas (Peeling e Hook, 2006). As razões para essa mudança de perfil são muito complexas, mas podem ser destacadas: a migração de pessoas de países onde a doença é mais prevalente, mistura populacional, mudança nos hábitos de risco incluindo o uso da internet para conhecer parceiros, o uso de drogas de recreação e a redução de práticas seguras de sexo entre homens homossexuais (Lynn e Lightman, 2004).

Dos 12 milhões de novos casos de sífilis que ocorrem anualmente no mundo, quase dois terços estão distribuídos na África Subsaariana (em

países como Quênia, Malawi, África do Sul, Zâmbia, Zimbábue, Moçambique), sul e sudoeste da Ásia. E cerca de 3 milhões na América do Sul e Central (WHO/HIV AIDS/2001.02).

Os dados de prevalência nos trópicos mostram que a sífilis, conforme a região é a segunda ou terceira causa de úlcera genital (outras são o cancro mole e herpes genital) (Goh, 2005).

A sífilis congênita continua sendo a principal causa de morte perinatal e neonatal em muitos países em desenvolvimento, onde exame pré-natal e tratamento não são realizados efetivamente (Schimid, 2004). Na África Sub-Saariana foi identificado que 17% das mulheres possuem um teste positivo para sífilis durante o pré-natal e que a porcentagem de co-infectadas com HIV é bastante elevada. Verificou-se que o diagnóstico da sífilis faz parte de uma rotina em 17 desses 22 (73%) países, mas a cobertura clínica e laboratorial foi para apenas 38% das mulheres grávidas (Watson-Jones, et al., 2002).

No Brasil, em 2003, estimaram-se 843.300 casos de sífilis. Não sendo doença de notificação compulsória, os estudos epidemiológicos são realizados em serviços que atendem DSTs ou grupos selecionados como gestantes, soldados, prisioneiros, etc. (Ministério da Saúde, 2005; Codes, et al., 2006; Szwarcwald, et al., 2005). A sífilis congênita é reflexo da incidência de sífilis adquirida nos adultos. No Brasil, apenas a sífilis congênita é de notificação compulsória (Portaria nº. 542, 22/12/86, D.O.U. 24/12/86). Trabalhos apontam média de 4% de positividade em teste não-treponêmico em gestantes atendidas em serviços públicos e prevalência de sífilis de 1,6%

em parturientes no Brasil em 2004 (Programa Nacional de DST/Aids, 2004). No estado de São Paulo os dados preliminares de um estudo sentinela em maternidades apontam para a prevalência de 1,6% (Boletim Epidemiológico, 2005).

Os casos registrados de sífilis congênita entre 1998 e 2004 foram no total de 24.448 (SVS/MS 1999; SVS/MS, 2005).

1.2. Agente etiológico

A sífilis é causada por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. O gênero *Treponema* pertence à ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae onde se classificam bactérias patogênicas de formato espiral. Desde o seu isolamento, em 1912, de líquido cefalorraquiano, *T. pallidum*, cepa Nichols vem sendo mantido e propagado por passagens seriadas em testículos de coelhos.

É uma bactéria de formato helicoidal (com 10 a 20 voltas), medindo cerca de 6 a 20 μ m de comprimento e apenas 0,10 a 0,18 μ m de diâmetro. À microscopia eletrônica, observa-se que possui um corpo procariótico envolvido por duas estruturas membranosas (membrana citoplasmática e membrana externa), entre as quais se enrola um filamento helicoidal de estrutura fibrilar inserido em grânulos citoplasmáticos nas extremidades do microrganismo, denominado filamento axial (endoflagelo) responsável por sua locomoção (Norris, et al., 1993).

A pequena diferença de densidade entre o corpo e a parede de *T. pallidum* faz com que seja prejudicada sua visualização á luz direta do microscópio. Cora-se fracamente, daí o nome pálido, do latim *pallidum*. (Alvelleira e Bottino, 2006).

Sua natureza fastidiosa e lento crescimento indicaram haver limitações metabólicas e exigências ainda não identificáveis de produtos do hospedeiro para seu desenvolvimento. Entre as dificuldades encontradas para estudar essa bactéria temos: *T. pallidum* não pode ser mantido em cultura celular contínua com células epiteliais de coelho “*in vitro*”, a microaerofilia, temperatura controlada entre 33 – 35°C, longo tempo de multiplicação (30 a 33 horas), baixo rendimento e pouca flexibilidade de manipulação. Dessa forma, o estudo da patogenia fica restrito a poucas passagens “*in vitro*” (Fieldsteel et al., 1982) e a estudos em modelo animal (coelho), onde se verifica a interação do hospedeiro – patógeno. No entanto, apresenta como dificuldade o fato do coelho, quando infectado, desenvolver apenas estágios semelhantes à sífilis primária e infecção disseminada. Os estágios tardios da doença nunca foram documentados em modelo animal (Stamm, 1999). Apesar dessas enormes deficiências nas ferramentas de pesquisa, a aplicação de modernas técnicas moleculares e imunológicas tem fornecido informações sobre a biologia de *T. pallidum* e a imunopatogênese da sífilis venérea (Salazar, et al., 2002).

Estudos para a identificação de polipeptídeos de *T. pallidum* começaram em 1975 e sua completa seqüência genômica foi publicada em 1998. O genoma de *T. pallidum* é um cromossomo circular de 1.138.006 bp

pares de base (bp), contendo 1041 ORFs fases de leitura abertas (“opens read frames - ORFs”) constituindo-se em um genoma bacteriano relativamente pequeno. Esses dados reforçam a hipótese de que o *T. pallidum* utiliza mecanismos de biossintese do hospedeiro para suprir suas necessidades metabólicas (Fraser, et al., 1998). Desses ORFs 55% possuem sua função biológica definida, 17% mostram homologia com proteínas de bactérias de outras espécies e 28% ainda não tiveram sua função caracterizada. Presume-se que entre estas últimas proteínas estejam aquelas que são responsáveis pela complexa estratégia de evasão da resposta imune do hospedeiro, grandes períodos de latência e a característica única de ser neuro-invasor e propenso à infecção congênita (Peeling e Hook, 2006).

O grande desenvolvimento nos estudos de identificação de polipeptídeos de *T. pallidum*, novas descobertas dos processos fisiológicos e bioquímicos poderão facilitar aos pesquisadores a criação e interpretação de novos modelos de diagnóstico e possíveis alvos para vacinas, lançando luz sobre a patogênese e manifestações clínicas da sífilis (Norris e Weinstock, 2000).

1.2.1. Antígenos imunodominantes de *Treponema pallidum*

A nomenclatura atual definindo polipeptídeos de *T. pallidum* foi padronizada em 1985 na reunião “Treponemal Pathogenesis and Immunity” realizada em Los Angeles. Assim, foi estabelecido o prefixo TpN (para *T. pallidum*, cepa Nichols) seguido da Mr (massa molecular relativa baseada

nos resultados de SDS-PAGE) e se necessário uma letra para distinguir peptídeos com Mrs similares (Norris, et al., 1987).

Ampla revisão sobre os componentes antigênicos de *T. pallidum* e suas propriedades foi relatada por Norris, et al., 1993. Os principais componentes antigênicos utilizados no imunodiagnóstico são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Importantes peptídeos no imunodiagnóstico da sífilis, outras designações e propriedades, adaptação de Norris, et al., 1993.

| Nome | Outras designações | Propriedades |
|---------|--|--|
| TpN47 | 47kDa; 48kDa; P6; 45kDa; 46kDa; TpS | Lipoproteína de membrana dominante, altamente imunogênica e específica, ativa células endoteliais. |
| TpN44,5 | TmpA; 42kDa; 44kDa | Lipoproteína de membrana; homologa ao <i>T. phagedenis</i> . |
| TpN37 | FlaA | Flagelina com sinal de peptídeo, associada com a bainha, apresenta seqüência semelhante ao <i>T. phagedenis</i> . |
| TpN33 | 33kDa, FlaB ₂ | Flagelina de classe B relacionada com TpN34,5 e TpN33, e flagelinas de outras bactérias localizada no core flagelar. |
| TpN30 | 32kDa, FlaB ₃ , 30kDa, 31,5kDa | Flagelina de classe B relacionada com TpN34,5 e TpN33, e flagelinas de outras bactérias. |
| TpN17 | Tpp17, 14kDa; 19G3 | Lipoproteína de membrana. |
| TpN15 | 15,5kDa, 12kDa | Lipoproteína de membrana; induz a resposta de anticorpos durante a infecção. |

No estudo da resposta humoral em sífilis experimental, Hanff et al., 1983, observaram reatividade muito precoce contra os antígenos TpN47 e TpN37 do *T. pallidum*, no período de três a seis dias após a infecção, seguida pela produção de anticorpos anti-moléculas do “core” endoflagelar

TpN33 e posteriormente, para outras duas lipoproteínas de baixo peso molecular TpN15 e TpN17.

Alguns autores relataram a importância do antígeno TpN47 como marcador da sífilis ativa, confirmado pela presença de anticorpos da classe IgM em *Western blotting* com amostras de soros de pacientes com sífilis congênita (Sanchez, et al., 1989; Lewis, et al., 1990, Lemos, 2002). Anticorpos da classe IgG e IgM estão presentes durante a sífilis primária e secundária. Anticorpo da classe IgM tem sua atividade diminuída durante os estágios tardios da sífilis e com a instituição do tratamento.

Durante a fase sintomática da sífilis primária, a primeira resposta identificada por *Western blotting* é contra proteínas de superfície de *T. pallidum* TpN47 e de flagelo, incluindo as proteínas TpN37, TpN33 e TpN30 (Byrne, et al., 1992). Amostras de soros de pacientes com sífilis secundária e latente recente contêm anticorpos dirigidos contra a maioria, senão todos, os componentes de *T. pallidum*. A reatividade, em geral, diminui em soros de pacientes não tratados, na sífilis latente tardia e sífilis terciária. As imunoglobulinas da classe IgG permanecem reativas o que justifica a positividade dos testes treponêmicos por longos períodos quando comparados com testes cardiolipínicos.

Anticorpos anti *T. pallidum* podem ser encontrados alguns dias após o início da sífilis primária, atingindo altos títulos quando a infecção se dissemina, durante o estágio secundário. Esses anticorpos permanecem detectáveis durante todo o curso da infecção e monitoraram a resposta a terapia, no seguimento do tratamento. Anticorpos da classe IgG e IgM estão

presentes durante a sífilis primária e secundária. Anticorpo da classe IgM tem sua atividade diminuída durante os estágios tardios da sífilis e com a instituição do tratamento (Backer-Zander, et al., 1985).

1.3. Patogenia

Apesar de *T. pallidum* ter sido identificado microscopicamente no início do século XX, a dificuldade de cultivar essa bactéria tem limitado a pesquisa sobre a patogenia da doença.

Muito do que se conhece da história natural da sífilis no homem foi o resultado de três grandes estudos, dois prospectivos e um retrospectivo. O primeiro estudo prospectivo foi realizado em 1891 em Oslo e, acompanhou 1978 pacientes com sífilis recente por mais de 20 anos observando mortalidade na sífilis não tratada de 8 a 14% dos infectados e foi possível concluir que aproximadamente 1/3 dos pacientes desenvolveram a sífilis terciária (com manifestações neurológicas, cardíacas e as lesões gomosas, um pouco mais benigna) (Clarck e Danbolt, 1964). O segundo realizado em 1932, por US Public Health Service, foi o controverso estudo Tuskegee, no qual 412 homens afro-americanos com sífilis latente foram monitorados sem receber tratamento por 40 anos. Nesse estudo, após 15 anos, 3/4 dos homens infectados mostraram evidências de sífilis terciária, sendo que em 50% as complicações foram cardiovasculares (Rockwell, et al., 1964). Pesquisadores da Escola de Medicina da Universidade de Yale realizaram o terceiro estudo, retrospectivo autopsiando 77 pacientes com sífilis não

tratada, desses 83% tiveram complicações cardiovasculares, 95 lesões gomosas ou esclerose delimitada a um órgão ou pequeno número de órgãos e 8% tiveram neurosífilis (Roahn, 1947). Pelos resultados desses estudos foram delineadas as fases clínicas através do processo evolutivo da sífilis no homem.

Apenas um terço dos indivíduos que tiverem contato com *T. pallidum* irão desenvolver a doença, o período de incubação desde a inoculação do organismo com *T. pallidum* até o aparecimento do protossifiloma depende do tamanho do inóculo, ou seja, com um inóculo de 10^7 organismos, o cancro aparece em 5 a 7 dias (dados obtidos com inoculações experimentais em animais e em humanos, Singh e Romanowisk, 1999). Ocorrem grandes alterações vasculares ricas em infiltrados celulares com predomínio de macrófagos e linfócitos TCD4+. Semanas após o início da infecção, uma resposta local e sistêmica é provocada tanto no homem como em animais de laboratório, observando-se significativa diminuição do número de espiroquetas no local da inoculação, as variações vasculares apresentam predomínio de linfócitos TCD8+. A resposta imune celular é responsável pela resolução da sífilis primária e secundária, tanto nos modelos animais quanto no homem, levando a doença ao seu estágio de latência. Nas lesões de sífilis primária e secundária observam-se aumento na expressão de citocinas Th1 (IL-2 e IFN-gama) em humanos e em modelos animais. A transferência adotiva em estudos com coelhos, hamsters e cobaias indica que ambas as células T ou B são capazes de conferir resistência, no entanto, a resposta imune do hospedeiro não resulta em completa

erradicação da infecção. Seis meses após a infecção o hospedeiro adquire a chamada imunidade do cancro, isto é, não desenvolve lesão quando reinfectado com *T. pallidum* (Norris, 1988). Somente um terço dos pacientes não tratados para sífilis evoluem para “cura” espontânea, definida como perda das manifestações clínicas e diminuição da reatividade sorológica, os outros irão desenvolver as formas tardias da sífilis. A importância da resposta imune celular na contenção da doença, e em sua patogenia reflete-se também na fase mais avançada, quando eventualmente ocorre a formação de gomas, com caráter necrosante, no local da infecção (Norris et al., 1993; Singh e Romanowski, 1999; Salazar, et al., 2002; Peeling e Hook, 2006).

Apesar de todos esses estudos, ainda não estão completamente esclarecidos o papel da resposta imune celular e humoral e quais antígenos de *T. pallidum* são os responsáveis pela imunidade protetora observada em humanos e coelhos (Peeling e Hook, 2006).

Pouco se conhece sobre a composição protéica da membrana externa da bactéria. Sabe-se que é composta por lipídeos e têm poucas proteínas transmembrânicas expostas em sua superfície que expressem determinantes antigênicos virulentos, permitindo à bactéria a evasão do sistema imune do hospedeiro (Norris, et al., 1993, Peeling e Hook, 2006).

T. pallidum não contém lipopolissacárides, mas as lipoproteínas presentes sob a membrana externa são fortemente imunogênicas e têm-se mostrado capazes de ativar a resposta inflamatória inata via receptor “Toll-like-receptor” (TLR4). Essas proteínas são apresentadas por macrófagos

após a lise do microrganismo pelo vacúolo fagolisossomal (Salazar, et al., 2002).

O mecanismo de infecção latente e por longos períodos ainda não está bem elucidado, mas algumas possibilidades seriam: localização do organismo em “nichos protegidos”; baixa antigenicidade da membrana externa de *T. pallidum* como resultado da baixa variabilidade protéica dessas membranas; mascaramento das proteínas de superfície do treponema por proteínas do hospedeiro ou glicosaminoglicanas e localização intracelular do microrganismo (Norris, et al., 1993, Peeling e Hook, 2006).

A patogênese do *T.pallidum* na mulher grávida está relacionada à habilidade dessa bactéria em atravessar a barreira placentária e causar a morte fetal ou as manifestações de sífilis congênita recente ou tardia no recém-nascido. Nessa situação o parasita irá encontrar o hospedeiro com seu organismo alterado, favorecendo a ontogênese do desenvolvimento fetal. Ocorre gradual diminuição da intensidade da resposta imune inata e mediada por células, em favor da manutenção e do crescimento fetal, podendo resultar na “limpeza” incompleta de *T. pallidum* da lesão, permitindo o desenvolvimento de doença crônica. Existem evidências de estudos da infecção humana e animal que sugerem que uma resposta Th1 é iniciada na sífilis primária e então ocorre uma mudança gradual para uma resposta Th2 na medida em que a doença progride para o estágio secundário. O aumento na produção de citocinas inflamatórias IL-2, IFN- γ , TNF- α e prostaglandinas induzidas pela infecção fetal junto com a intensa resposta inflamatória

associada à ativação de macrófagos por lipoproteínas do treponema, podem ser responsáveis pela morte fetal ou nascimento de crianças nos estágios da sífilis precoce ou tardia (Peeling e Hook, 2006).

1.4. Fases clínicas da sífilis

A sífilis é classificada em múltiplos estágios ou fases em sífilis primária, secundária, latente (recente e tardia) e terciária (Centers for Disease Control, 1991; Norris e Larsen, 1995; Singh e Romanowski, 1999, Lautenschlager, 2006).

Sífilis primária

Depois do contato inicial e de um período de incubação que varia de 10 a 30 dias, os treponemas se disseminam através da corrente circulatória, mas, a multiplicação preferencial ocorre no local de entrada do microrganismo. Essa multiplicação acelerada provoca uma proliferação e infiltração celular produzindo a lesão inicial: o cancro primário ou protosifiloma. A lesão, normalmente indolor caminha para a cura espontânea ou segue para a fase de sífilis secundária, quando o paciente não recebe tratamento adequado. Aproximadamente 70% dos pacientes com sífilis primária possuem linfonodos infartados na região próxima ao protosifiloma.

O diagnóstico da sífilis primária é difícil de estabelecer, pois existe grande variedade dos sintomas e sinais, variação do período de incubação

que dependente do inóculo de *T. pallidum* e da resposta imunológica do hospedeiro e a possibilidade de não se notar o protosifiloma (Singh e Romanowisk, 1999; Lautenschlager, 2006). Os pacientes nem sempre relacionam seus sintomas com um contato sexual recente. Dessa forma, o diagnóstico definitivo, normalmente é dado por um teste sorológico em uma fase mais avançada da sífilis. O diagnóstico definitivo de sífilis primária requer a identificação de *T. pallidum* em material de lesão, aspirado de linfonodo ou biópsia (Larsen, et al., 1995).

Sífilis secundária

O organismo é invadido em todos os órgãos e fluídos corporais por *T. pallidum* e manifestações clínicas são observadas principalmente na pele e mucosas, após quatro a seis semanas do desaparecimento do protosifiloma ou seis meses do início da infecção. Sintomas e sinais não específicos como febre, dor de cabeça, dor de garganta, linfadenopatia generalizada, por vezes reações nas meninges e anorexia podem estar presentes. Aparece também “rush” cutâneo que pode ser generalizado, semelhante a outras dermatoses, ou preferencialmente nas palmas das mãos e plantas dos pés. Essas manifestações sistêmicas são espontaneamente curadas, podendo recorrer durante o primeiro ano da infecção em pacientes não tratados. Normalmente, no estágio secundário da doença os níveis de anticorpos são elevados, determinando uma sensibilidade de 100% em todos os testes sorológicos.

Sífilis latente (recente e tardia)

Refere-se ao período onde desaparecem os sinais e sintomas clínicos da sífilis secundária e a doença progride de uma manifestação de infecção aguda para crônica. O termo latente não significa que a doença não esteja progredindo ou que o paciente não possa infectar outras pessoas, principalmente a mãe o seu conceito.

A sífilis latente pode ser dividida arbitrariamente por critérios epidemiológicos em duas fases: latente recente e latente tardia. As infecções com menos de dois anos de duração são denominadas como sífilis latente recente. Nessa fase o paciente pode sofrer recaídas para um estágio de sífilis secundária, com recorrência de lesões cutâneas, mucosas, oculares e ocasionalmente a neurosífilis observada principalmente em pacientes co-infectados por HIV, mesmo quando tratados segundo esquemas terapêuticos considerados eficientes (Larsen, et al., 1995). Segue-se a fase de sífilis latente tardia que dura de 5 a 20 anos ou mais da infecção inicial, podendo dar lugar a sífilis terciária.

Sífilis terciária ou tardia

A patogênese da sífilis terciária ou tardia ainda não está completamente estudada. Frequentemente os sintomas ocorrem de 10 a 20 anos depois da infecção inicial. As lesões observadas na sífilis terciária são destrutivas e incluem neurosífilis em aproximadamente 8% dos indivíduos, doenças cardiovasculares em 10 a 15% dos pacientes e lesões da pele, ossos ou vísceras. Estudos da era pré-antibiótica mostraram que 15 – 40%

de indivíduos infectados e não tratados ou incorretamente tratados desenvolveram complicações tardias (Singh e Romanowski, 1999).

Neurossífilis

T. pallidum pode ocasionar lesões do sistema nervoso central, principalmente após a sífilis tardia, atingindo estruturas ectodérmicas, resultando em psicoses, demência e *tabes dorsalis*.

O tratamento inadequado da sífilis recente pode seguir-se no curto espaço de tempo de 6 meses a 1 ano, o aparecimento da neurossífilis recente. Esta atinge principalmente tecidos de origem mesodérmica, causando lesões nos nervos cranianos, acidentes vasculares cerebrais e meningites agudas. A neurossífilis recente é hoje observada em pacientes infectados pelo HIV, pela freqüente concomitância das duas infecções (Musher e Baughn, 1994; Eijk, et al., 1987).

A sífilis no sistema nervoso é assintomática ou sintomática com as seguintes formas: meningo-vascular, meningite aguda, goma do cérebro ou da medula, crise epileptiforme, atrofia do nervo óptico, lesão do sétimo par, paralisia geral e *tabes dorsalis*.

1.5. Sífilis congênita

É o resultado da disseminação hematogênica do *T. pallidum*, da gestante infectada não tratada ou inadequadamente tratada para seu

concepto, via transplacentária. A transmissão vertical pode ocorrer em qualquer fase gestacional ou estágio clínico da doença materna.

Existe marcada diferença no risco de contaminação do feto de acordo com a fase de contaminação da mãe. A probabilidade de transmissão placentária na sífilis primária e secundária não tratadas ou insuficientemente tratadas pode ser de 30 a 50% durante a gravidez, resultando em morte fetal intra-uterina, natimorto ou morte imediatamente após o nascimento. A proporção de infecção fetal relatada foi de 50% quando a mãe estava com sífilis na fase primária, 67% na sífilis secundária e 83% na sífilis latente recente. Quanto maior o tempo que a mãe tenha sido infectada antes da gravidez, maiores são as chances de sobrevivência fetal, com porcentagens de infecção diminuindo progressivamente até 10% na sífilis latente tardia (Ramos, et al., 1991). A contaminação do feto pode ocorrer em qualquer momento da gestação por passagem do microrganismo através da placenta ou no momento do parto, quando a lesão genital ativa pode contaminar o recém-nascido (Singh e Romanowski, 1999).

Não temos o estágio de sífilis primária na doença congênita, pois o microrganismo infecta diretamente a corrente sangüínea da circulação fetal. Treponemas ou os seus efeitos patogênicos podem ser observados em todos os tecidos da criança (Larsen, et al., 1995).

Podem ser definidas duas fases na sífilis congênita, a precoce, quando ocorre do nascimento até dois anos de idade e a tardia, após dois anos de idade.

Sífilis congênita precoce: é aquela em que há manifestações clínicas logo após o nascimento ou, pelo menos, durante os primeiros dois anos. Na maioria dos casos, estão presentes já nos primeiros anos de vida. Assume diversos graus de gravidade, sendo sua forma mais grave a sepse maciça com anemia intensa, icterícia e hemorragia. Apresenta lesões cutâneomucosas, como placas mucosas, lesões palmo-plantares, fissuras radiadas periorficiais e condilomas planos anogenitais, lesões ósseas, manifestas por periostite e osteocondrite, lesões do sistema nervoso central e lesões do aparelho respiratório, hepatoesplenomegalia, rinites sanguinolentas, pseudoparalisia de Parrot (paralisia dos membros), pancreatite e nefrite.

Sífilis congênita tardia: é a denominação reservada para a sífilis apresentada após o segundo ano de vida. Corresponde em linhas gerais, à sífilis terciária do adulto, por se caracterizar por lesões gomosas ou de esclerose delimitada a um órgão ou a pequeno número de órgãos: fronte olímpica, mandíbula curva, arco palatino elevado, tríade de Hutchinson (dentes de Hutchinson + cenatite intersticial + lesão do VIII par de nervo craniano), nariz em sela e tibia em lâmina de sabre (Zanini e Andrade, 1982).

A definição de caso de sífilis congênita vem passando por diferentes modificações nas últimas duas décadas em todo o mundo. No Brasil, a sífilis congênita passou a ser uma doença de notificação compulsória a partir de 1986 (Portaria nº. 542, 22/12/86, D.O.U. 24/12/86). Desde então

houve três revisões da definição de caso de sífilis congênita, a última ocorrendo em 2003, após reuniões dos Comitês Assessores de Epidemiologia e de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Programa Nacional de DST/AIDS. Os critérios para se estabelecer se uma criança é portadora de sífilis congênita são encontrados no Anexo A.

1.6. Diagnóstico de laboratório da sífilis

O diagnóstico de laboratório baseia-se na evidenciação de treponemas nas lesões ou, mais freqüentemente, na detecção e quantificação de anticorpos suscitados pela infecção. Cada fase clínica da sífilis apresenta um método diagnóstico mais adequado (Camargo, 2001).

Desde o desenvolvimento do primeiro teste sorológico para sífilis, reação de fixação do complemento, em 1906, a padronização de novos testes tem sido uma das maiores preocupações, sempre objetivando elevados índices de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na obtenção de resultados confiáveis que assegurem ao clínico o valor preditivo bem próximo ao verdadeiro estado de saúde do paciente.

Os métodos de laboratório são classificados em diretos e indiretos.

Métodos diretos

Na sífilis recente, os treponemas podem ser evidenciados no material do protosifiloma, nas lesões cutâneas ou de mucosas da sífilis secundária e

congenita precoce, por observação direta em campo escuro, coloração pela prata, Leishman ou Giemsa, ou imunofluorescência direta (IFD).

A microscopia de campo escuro é o método mais empregado nos laboratórios de análises clínicas. A colheita do material nas lesões deve ser feita após cuidadosa assepsia local e escarificações. O líquido seroso é colocado entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio com aumento de 400 vezes. Quando a microscopia é feita por pessoal técnico devidamente treinado, a sensibilidade do método chega a 80% (Daniels et al., 1977; Romanowski, et al., 1987).

O teste de infectividade em testículos de coelhos (Rabbit Infectivity Test – RIT, 1907), é um dos mais sensíveis na pesquisa do microrganismo, no entanto é muito dispendioso possui alto risco de contaminação requerendo três a seis meses para sua execução (Larsen, et al. 1995). É utilizado como padrão ouro apenas por laboratórios de pesquisa na avaliação da sensibilidade de novos métodos, como a “Polymerase Chain Reaction - PCR” (Zoelchiling, et al., 1997), que ainda hoje não está disponível para uso em rotina laboratorial, nem se mostrou tão sensível quanto RIT (Singh e Romanowski, 1999). Estudos de sensibilidade e especificidade mostraram índices de 80% e 90%, respectivamente (Sanchez e Wendel, 1997; Salazar, et al., 2000).

A imunofluorescência direta para pesquisa de *T. pallidum* (IFD-Tp) descrita por Kellogg, em 1969, utiliza anticorpos específicos conjugados à fluoresceína. Quando anticorpos monoclonais são utilizados, o método é significativamente mais sensível que a microscopia de campo escuro, 92% e

80%, respectivamente (Cummings, et al., 1996). A sensibilidade desse método pode chegar a 100% quando material de lesões recentes é examinado (Larsen, et al., 1995). O Centro de Controle de Doenças (Center for Disease Control - CDC) recomenda que sejam realizadas biópsia de tecido e *IFD-Tp* quando os achados clínicos são sugestivos de sífilis e os testes sorológicos negativos (Young, 1998).

Um resultado negativo no exame direto do não exclui o diagnóstico de sífilis e deve ser repetido (Young, 1998). A identificação de *T. pallidum* em material de lesões suspeitas é o diagnóstico de certeza.

Métodos indiretos

Os métodos indiretos de diagnóstico da sífilis são classificados em cardiolipínicos, lipoídicos ou não treponêmicos e treponêmicos.

O teste cardiolipínico de Wasserman et al., 1906, reação de fixação de complemento, abriu fronteiras para a sorologia e até os anos 40 era considerado eficaz para a detecção da doença. Os pesquisadores utilizaram cardiolipina extraída de fígado de um natimorto de mãe com sífilis e conseguiram evidenciar anticorpos em inúmeros pacientes suspeitos da patologia. Durante muitos anos a técnica foi usada como referência para o diagnóstico da sífilis. Pela sua complexidade foi sendo substituída na rotina laboratorial por testes mais práticos e reprodutíveis.

O VDRL - Venereal Disease Research Laboratories descrito por Harris, et al., 1948 é ainda hoje o teste sorológico mais utilizado no mundo. É um teste de microfloculação, onde suspensões de cristais de colesterol como suporte da cardioplipina extraída de coração de boi, em meio aquoso contendo lecitina reagem com anticorpos presentes no soro de pacientes com sífilis. A sensibilidade do método varia de acordo com a técnica de preparação do reagente e com a fase clínica da doença. São variáveis técnicas dos testes cardioplipínicos o Carbotest e o "Rapid Plasma Reagin" (RPR) os quais foram padronizados para facilitar a leitura e interpretação dos resultados.

Os testes não-treponêmicos são sensíveis, baratos e permitem a avaliação pós-terapêutica pela queda de títulos de anticorpos presentes na circulação dos pacientes. Apresentam como desvantagens significativas à dificuldade de realização, automação e interpretação de resultados que precisam ser transcritos tornando-se possíveis fontes de erros. Também limitam sua utilização a baixa sensibilidade na sífilis primária e tardia, a possibilidade de efeito pró-zona e resultados falsos positivos biológicos.

Os resultados falsos positivos biológicos (FPB) têm sido relacionados com processos virais agudos (vírus Epstein-Barr, hepatites, mononucleose infecciosa, pneumonia virais), malária, imunizações e gravidez. E também podem estar associados a doenças crônicas do tecido conectivo, como lúpus eritematoso sistêmico, ou doenças associadas com anomalias de imunoglobulinas (Larsen, et al., 1995).

Resultados falsos negativos podem ocorrer por fenômeno de pró-zona, que consiste na inibição da aglutinação, por saturação dos sítios antigênicos por excesso de anticorpos. O fenômeno de pró-zona pode ocorrer em 1 a 10% dos pacientes com sífilis secundária (Young, 1998).

Os testes treponêmicos se baseiam na detecção de anticorpos contra componentes de *T. pallidum* utilizados como antígeno.

O primeiro teste treponêmico descrito foi o de imobilização de treponemas (TPI – *Treponema pallidum* Immobilization), Nelson & Meyer em 1949, que apresenta dificuldades técnicas e de aplicação, por trabalhar com treponemas vivos.

O teste de imunofluorescência indireta, conhecido como *Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption* (FTA-abs), descrito por Deacon, et al., 1957 é realizado após “absorção” ou bloqueio de anticorpos não específicos eventualmente presentes no soro, com extrato de cultura de *Treponema phagedenis*, biotipo Reiter (*sorbent*). Possui elevada sensibilidade e especificidade quando comparado com testes não-treponêmicos e é recomendado como teste de referência e confirmatório para sífilis. Pode ser utilizado para a pesquisa de anticorpos da classe IgG e IgM (Hunter, et al., 1964, Larsen, et al., 1986).

Outro teste treponêmico muito utilizado na triagem e no diagnóstico da sífilis é a hemaglutinação indireta para *Treponema pallidum* HATP, descrito

por Rathley, 1967. Essa técnica foi aperfeiçoada com a introdução do *sorbent* na solução estabilizadora e utiliza hemácias nucleadas de aves recobertas por componentes antigênicos de *T. pallidum*, que pela rápida sedimentação, permitem resultados após uma hora de reação. A sensibilidade e especificidade são comparáveis com o teste de FTA-abs, tendo como vantagens o custo reduzido e a praticidade técnica (Camargo, et al., 1987; Ferreira, et al., 1997). Em alguns países do mundo o reagente de micro hemaglutinação para pesquisa de anticorpos anti *T. pallidum* (MHA-TP) fabricado por Fujirebio Tokyo, é usado como referência para o diagnóstico da sífilis (Egglestone e Turner, 2000; Castro, et al., 2003).

O teste imunoenzimático – ELISA para o diagnóstico sorológico da sífilis foi padronizado por Veldkamp e Visser, em 1975, com antígenos protéicos de *T. pallidum* para a pesquisa de anticorpos da classe IgG. Atualmente existem diferentes variedades técnicas dos testes imunoenzimáticos com antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos, visando maior sensibilidade e especificidade na pesquisa de anticorpos IgG ou IgM anti *T. pallidum*. A sensibilidade reportada em diferentes trabalhos foi de 48,5%, quando avaliado com amostras de sífilis primária no início da infecção, a 100% nas outras fases da doença (Larsen, et al., 1995; Schmidt, et al., 2000; Rodriguez, et al., 2002). Quando bem padronizado, o método atinge elevados níveis de sensibilidade e especificidade, superando em algumas situações clínicas o tradicional FTA-abs (Young, et al., 1998). Os testes imunoenzimáticos foram projetados para grandes rotinas, pela

possibilidade de automação de seu procedimento. Por esse motivo, em muitos países o teste de VDRL foi substituído por testes imunoenzimáticos na triagem de doadores de sangue. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) facultou aos bancos de sangue a decisão do procedimento a ser adotado (RDC 343, 2002).

Os testes imunoenzimáticos que usam antígenos totais de *T. pallidum* têm sido substituídos pelo uso de proteínas recombinantes. São argumentos para a substituição: (i) fonte de antígenos ser constante e padronizada (ii) resultados com superior ou igual sensibilidade e especificidade (iii) robustez.

Para comparar a qualidade das muitas preparações de antígenos recombinantes de *T. pallidum* e avaliar seus desempenhos diagnósticos, utiliza-se principalmente a técnica de ELISA (Ijsselmuiden, et al., 1989; Fujimura, et al., 1997; Gerber, et al., 1997; Sato, et al., 1999; Ebel, et al., 2000). A sensibilidade e especificidade observadas têm sido comparadas às obtidas em testes de TPHA, FTA-abs ou ELISA com antígenos totais.

Recentemente a empresa de biotecnologia Abbott Diagnostic padronizou e está comercializando um teste rápido (imunodot), para triagem de indivíduos suspeitos de contato com pessoas portadoras de sífilis, registrado com o nome Determine. A vantagem desse teste que utiliza antígenos treponêmicos recombinantes é sua simplicidade de execução, dispensando o uso de equipamentos de laboratório, podendo ser realizado no campo. Licenciado pela ANVISA tem sido aplicado em postos avançados da guarda territorial e em pequenos bancos de sangue. A sensibilidade e

especificidade são comparáveis com o FTA-abs. Fator limitante para seu uso é o custo, ainda elevado para nossos padrões.

O *Western blotting* (WB) foi avaliado para o diagnóstico sorológico da sífilis por HENSEL et al., 1985. Os elevados níveis de especificidade (100%) e sensibilidade (93,8% a 98,5%) foram confirmados em trabalhos posteriores (Dettori, et al., 1989, Byrne, et al., 1992, Young, et al., 1994, Sambri, et al., 2001). O WB usando conjugado anti-IgG humana demonstrou ser tão sensível quanto o teste de FTA-abs, sendo sugerido como teste confirmatório para sífilis, por sua maior objetividade de leitura (Byrne, et al., 1992). O desempenho desse teste na sífilis é semelhante ao do WB confirmatório para HIV (Larsen et al., 1995).

Embora não existam muitos trabalhos de aplicação do método, verificamos unanimidade dos pesquisadores na definição dos componentes imunodominantes de *T. pallidum*, que possam apresentar significado clínico quando interagem com soros de pacientes com sífilis. Componentes protéicos de TpN15 a TpN47 são antígenos imunodominantes de *T. pallidum* reconhecidos por soros de pacientes em diferentes fases clínicas da doença (Sanchez, et al., 1989; Lewis, et al., 1990; Meyer, et al., 1994).

Os resultados do trabalho de mestrado desenvolvido por Lemos em 2002 e publicado em 2007, abriram perspectivas quanto à possibilidade de se utilizar o método de *Western blotting* (WB) como confirmatório da sífilis. O WB foi padronizado para a pesquisa de anticorpos IgG anti *T. pallidum* em amostras de soros de pacientes com sífilis adquirida, bem

caracterizadas clínica e laboratorialmente em diferentes fases da doença, consideradas como verdadeiras positivas; amostras de soros de pacientes com outras patologias e de doadores de banco de sangue. Foi utilizado como antígeno o extrato antigênico de *T. pallidum* obtido a partir de extração com detergente anfótero Zwittergent® (Alderete, et al.,1985). Esse antígeno forneceu a melhor definição das proteínas TpN47, TpN17 e TpN15, imunodominantes de *T. pallidum* e com importante papel na sorologia da sífilis. Utilizando 122 amostras de soros de pacientes com sífilis obtivemos sensibilidade de 100% para o WB, maior que a obtida para a hemaglutinação (TPHA) 97.5% e o FTA-abs 94.3%. Os resultados obtidos para o teste de VDRL concordam com os dados da literatura, com menor sensibilidade nas fases primária e terciária da sífilis ficando em média com sensibilidade de 73.8%. A especificidade do método de WB analisado com 385 amostras de soros procedentes de doadores de sangue foi de 99.6% e com 135 amostras de soros de pacientes com outras infecções foi de 99.2%. A especificidade geral obtida com todas as amostras de soros ensaiadas foi para os diferentes testes de 99.5% para o WB, 99.2% para TPHA e 98% para o FTA-abs.

Outro ponto relevante do teste padronizado foi à ausência de reações cruzadas com amostras de soros de pacientes que apresentam patologias que podem ser interferentes no diagnóstico de banco de sangue como pacientes soropositivos para HIV, Hepatites (B ou C), HTLV-1; doença de Chagas e malária; ou patologias que podem ser interferentes em laboratório de análises clínicas e estão relacionadas à gravidez como citomegalia,

mononucleose e toxoplasmose ou podem oferecer reações cruzadas com a sífilis, toxocaríase, hanseníase e doença auto imune como lúpus eritematoso sistêmico ativo (LES).

Esses dados abriram à possibilidade de utilizar o método de WB como confirmatório e correlacionar o perfil de reatividade obtido com as fases clínicas da doença. Os resultados do estudo não diferem dos resultados obtidos por Bryne, et al., 1992 e Backhouse, 2001.

1.7. Justificativa

Em projeto de pesquisa realizado no período de 2001 - 2002 (FAPESP – nº 99/035-94-0) padronizamos o método de *Western blotting* (WB) com antígenos protéicos de *T. pallidum* para ser utilizado no diagnóstico da sífilis. Além dos elevados índices de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade obtidos, verificamos que soros de pacientes em diferentes fases clínicas da sífilis apresentavam padrão de reatividade específico contra proteínas de massa molecular variando de TpN15 à TpN47. Pela excelência dos resultados obtidos, passamos a ser consultados por diferentes segmentos da patologia clínica, para auxiliar e orientar laboratórios que apresentavam resultados inconclusivos nos testes comerciais disponíveis, fornecendo o reagente, para confirmação das análises realizadas.

Baseados em experiência anterior, decidimos proceder à industrialização do WB para obtenção de um produto robusto, que pudesse ser usado em diferentes locais sem perda da qualidade dos resultados.

A experiência adquirida em Cambridge – USA, junto à Cambridge Biotech Corporate, empresa de propriedade do grupo francês bioMérieux, especializada na produção do WB confirmatório para HIV e HTLV foi fundamental para o desenvolvimento de um produto robusto e prático.

Fazer o “scaling up” e controlar todas as etapas da industrialização do WB, não é tarefa fácil e requer cuidados excessivos para diminuir a perda de reagentes sem que a qualidade final seja prejudicada.

Além de padronizar todas as etapas da industrialização do WB, descrevemos também os critérios para o controle de qualidade (CQ), dentro de um programa de “Boas Práticas de Fabricação” exigidas pela ANVISA.

Nosso intuito neste trabalho foi mostrar que, para grandes volumes, a reprodutibilidade dos resultados só é alcançada quando temos produtos industrializados que passaram por rigoroso CQ, podendo ser armazenados por longos períodos em condições apropriadas.

Com o produto desenvolvido, pudemos analisar o seu desempenho em diferentes serviços, não apenas como mais um método treponêmico diagnóstico, mas como confirmatório de casos inconclusivos ou reagentes pela sorologia convencional.

Os resultados obtidos e as observações feitas durante a sua aplicação credenciaram o WB a fazer parte do algoritmo para o diagnóstico da sífilis como método confirmatório.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Industrializar as etapas da produção do **WB Tp-IgG**, analisar o seu desempenho diagnóstico e propor sua utilização como confirmatório em algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis.

Objetivos específicos

1. Definir critérios para a produção industrial do **WB Tp-IgG**.
2. Desenvolver o reagente **WB Tp-IgG** para pesquisa de anticorpos IgG anti *Treponema pallidum*.
3. Aplicar e analisar o comportamento do **WB Tp-IgG** em diferentes serviços.
4. Propor um novo algoritmo para o diagnóstico laboratorial da sífilis tendo o **WB Tp-IgG** como método confirmatório.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Grupo 1: Soros controle positivo e negativo N = 12.

Foram selecionadas oito (8) amostras de soros padrões positivos e quatro (4) amostras de soros padrões negativos, definidos por critérios clínicos, laboratoriais e epidemiológicos pertencentes ao painel de soros de sífilis da soroteca do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-SP). Essas amostras foram utilizadas nas diferentes etapas do Controle de Qualidade (CQ) do reagente **WB Tp-IgG**.

Grupo 2: Soros de gestantes atendidas durante o pré-natal no Hospital Universitário Gaffrè e Guinle (UNI-RIO) e na Maternidade Pro Matre (SUS), da cidade do Rio de Janeiro N = 175.

As amostras de soros foram selecionadas pelo método de VDRL a partir da diluição de 1:1.

As gestantes apresentaram idades que variaram de 12 a 48 anos sendo que a média foi de 22 anos.

As amostras de soros das gestantes foram obtidas da primeira consulta do pré-natal. O teste de VDRL foi realizado em duplicata e, em seguida, os soros submetidos a provas específicas (ELISA, TPHA e **WB Tp-IgG**).

Grupo 3: Soros de pacientes recém infectados com o vírus da imunodeficiência humana (N = 156)

As amostras de soros pertencem a uma coorte de 156 pacientes recém infectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV) da Universidade Federal de São Paulo – Divisão de Doenças Infecciosas da Escola Paulista de Medicina (Kallas, et al., 2004) e foram submetidas a testes sorológicos para sífilis para verificar a co-infecção.

As 156 amostras de soros de pacientes recém infectados com o HIV apresentaram idades que variaram de 18 a 70 anos sendo que a média foi de 32 anos. Dessas amostras 143 (91,7%) eram de pacientes do sexo masculino e 13 (8,3%) feminino. Todas as mulheres eram heterossexuais e entre os homens 14 (9,8%) eram heterossexuais e 129 (90,2%) homossexuais.

Todas as amostras de soros foram avaliadas por VDRL, TPHA, FTA-abs e como teste confirmatório foi utilizado o **WB Tp-IgG**.

Grupo 4: Soros de banco de sangue com resultados reagentes ou inconclusivos N = 52.

Foram selecionadas 52 amostras de soros com resultados reagentes ou inconclusivos provenientes de triagem sorológica de doadores de sangue de um Laboratório de Hemocentro de São Paulo. Essas amostras foram procedentes da triagem sorológica de 2.990 amostras de soro pelo teste treponêmico ELISA.

Grupo 5: Soros de laboratório clínico com resultados reagentes ou inconclusivos N = 67.

Foram selecionadas 67 amostras de soros com resultados reagentes ou inconclusivos pelo teste treponêmico ELISA, segundo a rotina do laboratório clínico.

Grupo 6: Soros controle da especificidade do *WB Tp-IgG* N = 60.

Para avaliação da especificidade do *WB Tp-IgG* foram selecionadas 60 amostras de soros, pertencentes a diferentes serviços. Esse grupo de soros foi utilizado como amostras negativas em cálculos de especificidade e valores preditivos, junto às amostras reagentes dos grupos G2 e G5.

3.2. Caracterização sorológica das amostras de soros

Algumas amostras de soros dos grupos estudados foram ensaiadas por testes de hemaglutinação (TPHA), imunoflorescência (FTA-abs) e VDRL, segundo as especificações da bula. Alguns reagentes foram fornecidos por bioMérieux–Brasil.

O teste de ELISA anti-imunoglobulinas totais foi realizado utilizando a diluição de amostra 1/4.

Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Para a reação de FTA-abs as amostras de soros foram consideradas reagentes com diluição inicial de 1/5 em *sorbent*. Amostra de soro padrão de reatividade limiar fornecida pelo Center of Diseases Control (CDC), soro

padrão positivo e negativo foram ensaiados como controle da reação de FTA-abs. Nas reações de hemaglutinação, a diluição inicial das amostras de soros foi 1/80 e soros controle positivo e negativo foram ensaiados para validação da reação. No teste de VDRL, as amostras de soros foram ensaiadas nas diluições de 1/1 e 1/10 em solução fisiológica (NaCl 0,85%) para evitar o fenômeno de pró-zona e falsos resultados negativos (FRN) e eventualmente as amostras foram tituladas. A leitura foi realizada imediatamente, em microscópio com objetiva 40X, iniciando sempre pelos controles negativo e positivo.

Amostras de soros que apresentaram resultados conflitantes ou inconclusivos em alguma técnica foram ensaiadas em duplicata e o novo resultado encontrado foi considerado como verdadeiro.

Resumidamente, a reação como kit **WB Tp-IgG** foi realizada diluindo-se a amostra de soro padrão positivo a 1/100, incubada com as fitas de nitrocelulose sensibilizadas numeradas, por 18 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a incubação as fitas foram lavadas por cinco vezes com PBS-Tw por 5 minutos cada vez, a reação antígeno-anticorpo foi evidenciada por conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase, seguindo-se de incubação por duas horas. Após novo ciclo de lavagens, enzimática foi revelada pela adição de solução cromogênica de 4-cloro α -naftol (4CN). A reação foi interrompida pela lavagem com água destilada e as fitas foram deixadas entre folhas de papel de filtro para secarem e coladas no protocolo de controle de qualidade correspondente. O **WB Tp-IgG** foi considerado reagente quando ao menos uma banda de massa

molecular específica de *T. pallidum* correspondente a TpN15, TpN17 e/ou TpN47 foi positiva. Ausência de reatividade na região de proteínas correspondente as massas moleculares de TpN 47 a TpN15 (bandas reagentes) foi considerado como resultado não reagente. Amostras de soros controle negativo e positivo foram ensaiadas em paralelo para a validação e comparação de perfil de reatividade.

3.3. Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) em 15.08.2006, segundo o protocolo de pesquisa nº 170/04, apresentado pela Área de Fisiopatologia Experimental.

As amostras de soros pertencentes aos diferentes serviços e utilizadas no projeto tiveram aprovação por Comissões de Ética locais. As aprovações das Comissões de Éticas envolvidas na tese de doutorado estão apresentadas no Anexo B.

3.4. Industrialização das etapas do processo de fabricação do *Western blotting* (WB) com antígenos de *Treponema pallidum* (Tp) utilizado na pesquisa de imunoglobulinas da classe G (IgG) - **WB Tp-IgG**.

Para a industrialização do **WB Tp-IgG** foram seguidas as boas práticas de fabricação conforme exigência da ANVISA (Portaria 686) transformando o reagente em kit diagnóstico, para ser utilizado em diferentes serviços, no diagnóstico e confirmação sorológica da sífilis.

Foram exigências desse processo: (i) reprodutibilidade na produção de diferentes lotes; (ii) qualidade do processo da fabricação e do produto obtido; (iii) custos exequíveis (iv) obtenção de um produto final robusto e de fácil manipulação.

Para a industrialização foi definido como volume do lote, sub-lotes de 36 géis, preparados com as mesmas soluções, durante uma mesma semana de trabalho. O volume dos sub-lotes depende do limite dos equipamentos disponíveis no laboratório. No laboratório, o limite para a fabricação de um sub-lote foi definido para o preparo de 36 géis o que corresponde a 36 membranas dando origem a 1296 fitas.

As etapas do processo de fabricação industrial do **WB Tp-IgG**, compreendem: (i) definição de protocolos de fabricação, (ii) formulação e preparo de soluções, (iii) validação dos equipamentos, (iv) obtenção e manutenção de *Treponema pallidum*, (v) obtenção de componentes antigênicos de *T. pallidum*, (vi) controle de qualidade do extrato antigenico

preparado, (vii) industrialização de SDS-PAGE e *Western blotting*, (viii) controle de qualidade, preparo e formatação dos reativos complementares, (ix) desenvolvimento do reagente **WB Tp-IgG** na forma de um kit diagnóstico, (xi) controle global do reagente preparado.

No Anexo C foi descrito o fluxograma de industrialização do **WB Tp-IgG**.

3.4.1. Obtenção e manutenção de *Treponema pallidum*

Os coelhos utilizados na produção de antígenos de *T. pallidum* foram tratados atendendo-se as exigências do Nacional Research Council (NCR, 1977), com livre acesso à água e alimentação. Posteriormente, foram sacrificados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal e para minimizar a dor e o desconforto, foram sedados com acepromazina (Acepran 0,2% - Univet S.A. – São Paulo – SP).

A obtenção de *T. pallidum* em volume suficiente para uma produção industrial ocorreu após a adequação do biotério à manipulação dos animais.

T. pallidum, cepa Nichols, foi mantida por passagens seriadas em testículos de coelhos. Foram selecionados, para cada produção, 20 coelhos de oito meses de idade, das raças, Nova Zelândia, Cross, Califórnia ou Chinchila, apresentando bom aspecto, que não receberam medicação durante as duas últimas semanas. Esses coelhos foram mantidos em ambiente de confinamento, a 18 °C, recebendo ração sem antibióticos e coccidiostáticos, por 10 dias antes da inoculação.

Os 20 animais selecionados receberam em cada testículo 1,0 mL de

suspensão rica em treponemas (80 a 100 treponemas móveis e viáveis por campo microscópico) e uma dose intramuscular de 0,2 mL de imunossupressor (Depo®Medrol – Acetato de metilprednisolona – The Upjohn Co., K., Michigam, EUA).

Após 10 dias da inoculação, os animais foram sacrificados e os testículos retirados em condições assépticas, em capela de fluxo laminar, utilizando material cirúrgico estéril. Os testículos foram separados de suas cápsulas, lavados com solução fisiológica e cortados em pedaços menores, colocados em solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M, pH 7,2 (PBS), contendo 10% de soro normal de coelho (SNC), por 30 minutos, a 37 °C, para a liberação dos treponemas. Após esse período, a solução foi examinada entre lâmina e lamínula em microscopia de campo escuro, com aumento de 400 vezes. Testículos que apresentavam rendimento de 80 a 100 treponemas viáveis por campo microscópico foram reunidos em “pool” e os que apresentavam rendimento inferior, descartados.

As soluções de treponemas, reunidas em “pool”, foram centrifugadas inicialmente a 2.800 rpm, por 10 minutos, a 4 °C, para retirada de “debris” celulares e a 10.000 rpm, por 30 minutos, a 4 °C. O sedimento foi lavado 2 vezes com PBS 0,01 M, pH 7,2 e após a última centrifugação armazenado em *freezer* -80 °C, até o momento do uso.

A manutenção de *T. pallidum* em testículos de coelhos ocorreu ininterruptamente, por passagens seriadas.

Após a obtenção de sedimentos de treponemas provenientes de 50 coelhos foi iniciada à preparação do extrato antigênico.

3.4.2. Obtenção de componentes antigênicos de *Treponema pallidum*

Para o preparo do extrato antigênico de *T. pallidum* foi utilizado o detergente anfótero Zwittergent[®] (Zw) - Calbiochem Co, La Jolla, CA-USA, (Alderete et al., 1985).

Tubos contendo sedimentos de treponemas, provenientes de 100 testículos de coelhos, foram ressuspensos, cuidadosamente, com 3,0 mL de PBS 0,01 M, pH 7,2, acrescido de inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila a 1 mM (PMSF - phenyl-metil-sulfonil-fluoreto - Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). À suspensão foi acrescentado 300,0 µl de PBS 0,01M, pH 7,2 contendo Zw a 10% (PBS/Zw 10%), cuidadosamente homogeneizada, acrescida de 5,5 mL de PBS 0,01 M, pH 7,2, acrescido de PMSF 1 mM. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes. A solução foi observada entre lâmina e lamínula à microscopia de campo escuro, para verificar a ausência de grumos ou treponemas íntegros, submetida à centrifugação, 18.000 rpm, 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi dialisado em membrana benzoilata (D-7884, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA 2000) por 24 horas, com três trocas de solução PBS 0,01M, pH 7,2. O volume final obtido, aproximadamente 30 mL, foi aliqotado em tubos tipo Nalgen, contendo 5,0 mL cada e congelados em freezer -80 °C. Uma alíquota de 2,0 mL foi separada para o controle de qualidade do antígeno. O extrato produzido foi denominado extrato de *T. pallidum*, Zwittergente (extrato *Tp-Zw*), e foi identificado pelo número de lote.

O extrato *Tp-Zw* obtido foi controlado por dosagem protéica, gel de SDS-PAGE corado pelo método da prata e por *Western blotting* com soro padrão positivo.

A seqüência de fabricação do extrato *Tp-Zw* foi descrita em um fluxograma, Anexo D.

3.4.3. Controle de qualidade do extrato antigênico de *Treponema pallidum*

Dosagem protéica

A dosagem protéica do extrato *Tp-Zw* obtido foi realizada utilizando o método “Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent” (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA), fundamentado em metodologia descrita por Lowry et al., 1951. Como padrão foi utilizado albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE

A qualidade do extrato antigênico de *T. pallidum* foi avaliada utilizando o método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli, 1970 em aparelho Mini Protean II (Bio-Rad®). Foram preparados géis de SDS-PAGE, que foram corados pelo método da prata e outros foram utilizados na reação de WB após serem transferidos para membranas de nitrocelulose.

Resumidamente, extrato antigênico de *T. pallidum* foi diluído em tampão de amostra 5X concentrado (Tris-HCl 0,5 M pH6,8; SDS 1%, glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 14,4 mM e azul de bromofenol 0,01% como indicador final de corrida) e fervido a 100°C por 5 minutos, imediatamente antes da aplicação no gel.

O volume de proteína do extrato *Tp-Zw* utilizado em cada gel de SDS-PAGE foi expresso em $\mu\text{g}/\text{mm}$ de gel. Utilizamos pente preparatório de 80 mm de largura por 0,7 mm de espessura e o extrato antigênico foi titulado nas concentrações de 1, 2 e 3 $\mu\text{g}/\text{mm}$ de gel.

O gel de poliacrilamida de separação foi preparado com acrilamida/bisacrilamida na concentração final de 12%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e o gel de empilhamento com acrilamida/bisacrilamida na concentração final de 4%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, ambos contendo 0,1% de SDS. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (solução de Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%), utilizando fonte *Power PAC 200* (Biorad) inicialmente a 60 Volts até o empilhamento das amostras no início do gel de separação, por aproximadamente 30 minutos, quando então a voltagem foi aumentada e mantida em 120 Volts até o final da corrida.

O marcador de Massa molecular (MM) utilizado foi o padrão *Full Range RainbowTM* (Amersham Life Science, England HP7 9NA).

Western blotting

As frações protéicas separadas em SDS-PAGE foram transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose de 0,2 μ (PROTAN [®]

BA83 - Schleicher & Schuell), segundo técnica descrita por Towbin, et al., 1979.

A transferência úmida foi realizada, por 18 horas, em aparelho Mini Protean Trans-Blot Transfer® (Bio-Rad).

Após a transferência as membranas foram bloqueadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, com solução de leite desnatado 5% em PBS 0,01 M pH 7,2 acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS-Tw). Em seguida, colocadas para secar, entre folhas de papel toalha, em estufa 37 °C, com ventilação, por 4 horas, carimbadas para identificação. Posteriormente, foram cortadas em fitas de 3 mm, transferidas para tubos de vidro e armazenadas em geladeira a 4 °C, até o momento do uso.

A atividade imunológica do extrato *Tp-Zw* foi avaliada por *Western blotting* com amostra de soro padrão positivo, pertencente ao painel de controle de qualidade de sífilis (painel CQ - Sífilis).

3.4.4. Industrialização do SDS-PAGE e *Western blotting*

SDS-PAGE

A produção de um lote de SDS-PAGE envolve as seguintes etapas: (i) preparo das soluções de trabalho; (ii) montagem do equipamento gel formador; (iii) preparo do gel de SDS-PAGE de separação a 12%; (iv) desmontagem do equipamento gel formador; (v) separação dos conjuntos de géis e controle de qualidade; (vi) montagem de 2 conjuntos de géis no suporte para modelagem inferior; (vii) preparo do gel de empilhamento a 4%,

(viii) montagem da câmara para tampão de corrida superior com 2 conjuntos de géis; (ix) verificação de vazamentos; (x) preparo da amostra a ser aplicada e (xi) corrida eletroforética.

Durante as fases da produção uma seqüência de trabalho foi adotada. O equipamento gel formador recebeu uma marcação que acompanhou o gel em todas as etapas do processo. O equipamento foi marcado com a letra A e todos os géis fabricados receberam essa letra, do início ao final da fabricação. Quando trabalhamos com três equipamentos de gel formador esses foram marcados com a letra A, B e C.

Durante o preparo das soluções e suas formulações verificou-se o volume e o estoque de sais necessários a essas fabricações, o pH, a pesagem dos sais, o uso de equipamento de segurança, procedimentos de planejamento foram executados para garantir a qualidade do produto a ser obtido.

As soluções estoque necessárias à produção foram preparadas na semana anterior à fabricação.

Foram preparados 12 litros de tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM), solução mãe concentrada, pH $8,5 \pm 0,2$, com validade de 2 meses. Solução de acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,9%, 750 mL, validade de 1 mês, como a solução é neurotóxica sua manipulação foi rápida com o uso de equipamento de proteção individual tipo máscara para gases e poeira, luvas e processada em capela. 270,0 mL de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS), com validade de 2 meses. Glicerol a 20%, 2160 mL, com validade de 3 meses. 360 mL de Tris 3 M, pH $8,8 \pm 0,1$, validade de 1 mês. 120 mL de Tris 0,5 M, pH

6,8 ± 0,1, com validade de 1 mês. Tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 ± 0,1, 450 mL de solução mãe 10 vezes concentrada, com validade de 1 mês. 60 mL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 1%, glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 14,4 mM e azul de bromofenol 0,01% como indicador final de corrida), solução mãe 5 vezes concentrada, com validade de 2 semanas, o reagente 2-mercaptoetanol foi adicionado a mistura apenas no momento do uso. Em frasco adequado pesou-se 1,2 g de persulfato de amônio, que foi hidratado somente no momento do uso.

As outras soluções foram preparadas apenas no momento do uso, 860 mL de solução de gel de poliacrilamida de separação contendo acrilamida/bisacrilamida na concentração de 12%, Tris-HCl 3,0 M pH 8,8 e SDS a 0,1%. Solução de gel de poliacrilamida de empilhamento contendo acrilamida, bisacrilamida na concentração de 4%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS a 0,1%, num volume de 160 mL. Seis litros de tampão de corrida superior (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%) e 30 litros de tampão de corrida inferior Tris 25 mM, glicina 192 mM, essas soluções podem ser usadas no prazo de 2 semanas, podendo ser reaproveitadas no máximo para 3 corridas eletroforéticas.

Para a montagem de 36 géis de SDS-PAGE foi utilizado o equipamento formador de gel múltiplo (Cambridge Biotech Corporate), que comporta 54 placas de vidro. São dois os tipos de placas utilizadas uma denominada placa inteira (pi) e outra a placa de divisão (pd) que é entalhada ou cortada, ambas medem 18 cm de comprimento e diferem em 2 cm na altura. Os espaçadores (esp) utilizados medem 2,0 cm de largura por 16,0 cm de comprimento por 2,0

mm espessura. A seqüência de montagem seguida foi esp-pi-esp-pc-esp-pi-esp. Cada seqüência contém 2 géis ou um conjunto. No total, foram montadas 18 seqüências, que utilizaram 18 pc e 36 pi.

Para cada 36 géis foi utilizado 860 mL de solução de gel de poliacrilamida de separação a 12%, suficiente para formar géis de 16 cm de largura por 7 cm de comprimento e 2,0 mm de espessura.

Após a formação dos 36 géis de separação procedemos à desmontagem dos 18 conjuntos (com 2 géis cada), estes foram transferidos para um equipamento denominado suporte de modelagem inferior (Hoefler SE 600, cód. 80-6175-00). Esse suporte comporta dois conjuntos de géis, um de cada lado. Foram preparados 160,0 mL de solução de gel de poliacrilamida de empilhamento a 4% e 5,0 mL dessa solução foi adicionada a cada gel.

Respeitando as fases da fabricação e a seqüência de trabalho, para cada gel um número serial foi adotado. Esse número foi seqüencial do 1 ao 36, do 37 ao 72 e do 73 ao 108 e acompanhou o processo de transferência para a membrana de nitrocelulose e as etapas de controle de qualidade.

Após a formação do gel de empilhamento dois conjuntos foram montados no equipamento denominado câmara para tampão de corrida superior (Hoefler SE 600, cód. 80-617636). Seis litros de tampão de corrida superior contendo SDS 0,1% foram preparados e adicionados a cada câmara. Três câmaras para tampão de corrida superior foram montadas com conjuntos de géis de poliacrilamida e posicionadas no equipamento denominado cuba de corrida eletroforética (desenvolvido por Cambridge Biotech Corporate). Cada cuba de corrida eletroforética foi completada com 10 litros de tampão de

corrida inferior e processou a corrida eletroforética de 12 géis.

Foram aplicados 2,50 μ g por milímetro de gel ou 400 μ g por gel de extrato *Tp-Zw*. Para os 36 géis preparados, foram utilizados 14,4 mg ou 3,7 mL de extrato *Tp-Zw*. O extrato foi diluído em tampão de amostra 5X concentrado, fervido a 100 °C por 5 minutos e 500 μ l foi aplicado a cada gel, com o auxílio de uma seringa e agulha sem ponta.

A corrida eletroforética foi estabelecida em voltagem constante de 240 Volts, fornecida por uma fonte EPS1001 (Amersham Pharmacia Biotech), o tempo total envolvido de 3 horas. Faltando 1 cm para que o indicador de corrida do tampão de amostra saísse do gel, a eletroforese foi interrompida.

Western blotting

A preparação do *Western blotting* envolve as seguintes etapas: (i) preparo de soluções; (ii) corte de membranas de nitrocelulose; (iii) equilíbrio das membranas em tampão de transferência; (iv) desmontagem de conjunto de gel de SDS-PAGE; (v) montagem de sanduíche de transferência de proteínas do gel para membrana de nitrocelulose; (vi) bloqueio das membranas de nitrocelulose; (vii) secagem em estufa 37°C; (viii) identificação e corte das membranas produzidas e (ix) quarentena das fitas em tubos para controle de qualidade.

As soluções estoque necessárias à produção foram preparadas na semana de uso e apresentam validade de duas semanas. Foram preparados 35 litros de solução tampão de transferência de proteínas (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol a 20%). Solução de bloqueio PBS 0,01 M, pH 7,2,

contendo leite desnatado 5% e Bronidox 1,0% (Carechemicals), em volume de 1,2 litros.

As membranas de nitrocelulose de 0,2 μ (Protan® BA83) e papel de filtro (Protan® GB 002) foram adquiridos do mesmo fornecedor Schleicher & Schuell. Foi utilizado espuma Schotch Brite (espuma SB) para formar o “sanduíche” de gel (Rolos de Schotch Brite – Tipo F).

Foi preparada a solução tampão de transferência de proteínas. As membranas de nitrocelulose S&S foram cortadas, com auxílio de guilhotina, nas dimensões de 13,0 cm de largura por 6,6 cm de comprimento e deixadas submersas em tampão de transferência por um período de uma hora para equilíbrio das forças iônicas do tampão com as membranas. Esse mesmo procedimento foi adotado para as folhas de papel de filtro e espuma SB que foram utilizadas no cassete de montagem.

Após o fracionamento das proteínas em gel de poliacrilamida nas cubas de corridas, as câmaras para tampão de corrida superior montadas com conjuntos de géis foram retiradas. Estas foram delicadamente desmontadas e separaram-se os conjuntos de géis de poliacrilamida do vidro com o auxílio de uma espátula. O gel de empilhamento foi cortado e descartado e o gel de separação cuidadosamente manipulado e colocado sobre a membrana de nitrocelulose nos cassetes de montagem para a transferência das proteínas. A ligação das proteínas à membrana de nitrocelulose ocorre devido a forças hidrofóbicas e a corrente eletroforética aplicada. Essa transferência ocorreu em tanque de transferência (ISS Megadalt, USA), onde foram colocados 6 cassetes de montagem formados por “sanduíches” de espuma SB, papel de

filtro (S&S), membrana de nitrocelulose (S&S), gel de poliacrilamida de separação, papel de filtro, espuma SB. Cada cassete de montagem continha 6 géis e 6 membranas de nitrocelulose. Esse “sanduíche” foi posicionado segundo os pólos específicos do tanque de transferência, sendo que o lado do conjunto contendo o gel de separação ficou em direção ao pólo negativo (cátodo) e o lado contendo a membrana de nitrocelulose em direção ao pólo positivo (anodo). O sistema foi completado com tampão de transferência de proteínas e colocado em ambiente com temperatura controlada em 22-25 °C. Durante o processo de transferência foi utilizada uma Fonte EPS 1001 (Amersham Pharmacia Biotech) que forneceu uma corrente programada de 20 Volts por 18 horas. Após a transferência eletroforética as membranas de nitrocelulose forneceram réplicas fieis da resolução da separação das proteínas obtidas no gel de poliacrilamida a 12%.

Ao final das 18 horas de transferência, os conjuntos foram desmontados, as membranas de nitrocelulose bloqueadas por 15 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, foram lavadas com PBS-Tw, por 1 minuto e colocadas para secar, entre folhas de papel toalha, em estufa 37 °C com ventilação, por 4 horas.

Cada membrana identificada com seu número de fabricação foi carimbada utilizando um carimbo e tinta, com números em uma seqüência de 1 a 30 e esses números foram intercalados com letras. Essas letras se posicionam em 5 pontos, de 6 em 6 números, ou a cada 1,8 cm, entre o início e o final da membrana de nitrocelulose. Cada membrana foi cortada em fitas de 3 mm, com aparelho apropriado (Cambridge Biotech Corporate).

A numeração seguiu o modelo:

A 1 2 3 4 5 6 **B** 7 8 9 10 11 12 **C** 13 14 15 16 17 18 **D** 19 20 21 22 23 24 **E** 25 26 27 28 29 30 **F**

Após o corte, as fitas numeradas de 1 a 30, foram transferidas para frasco de vidro com tampa e as marcadas por letras (A, B, C, D, E e F) para outro frasco. Todos os frascos foram identificados com o número do gel de corrida e armazenados em quarentena em geladeira 5 ± 2 °C, até a realização do controle de qualidade (CQ) do lote. Quando ocorreram problemas no corte das fitas, estas também foram transferidas para tubos identificados e encaminhados ao controle de qualidade para reavaliação e registro de perdas.

Frascos do início, meio e fim da fabricação de cada sublote, correspondendo às membranas de número 1A, 18A e 36A e os frascos com as letras foram separados e encaminhados para realização de testes no CQ.

Controle de qualidade das fitas de nitrocelulose sensibilizadas com extrato antigênico de *Treponema pallidum*.

Para o CQ do primeiro lote utilizamos reagentes preparados e validados durante tese de mestrado de Lemos, 2002. As amostras de soros do grupo 1 foram utilizadas nas etapas de CQ do reagente.

Para o preparo do reagente **WB Tp-IgG** foi realizado o CQ imunológico das fitas de nitrocelulose marcadas com letras (A, B, C, D, E e F), verificando-se a homogeneidade do lote produzido e a qualidade da transferência do gel para a membrana de nitrocelulose, com amostra de soro padrão positivo, pertencente ao painel de controle de qualidade de sífilis (painel CQ – Sífilis).

Essa amostragem (6 fitas) garante a homogeneidade da corrida eletroforética em toda a membrana de nitrocelulose.

De cada frasco encaminhado para o CQ (frasco 1A, 18A e 36A) foram retiradas três fitas. Estas foram ensaiadas com amostra do soro controle positivo, negativo e amostra de soro com perfil de baixa reatividade pertencente ao painel de CQ - Sífilis, diluídas a 1/100. A reação foi validada com o kit referência. Essa amostragem representa o início, meio e final da fabricação e garante a homogeneidade do lote obtido.

3.4.5. Preparo dos reativos complementares para composição do reagente *WB Tp-IgG*.

Os reativos do reagente *WB Tp-IgG* foram preparados em função do número de fitas aprovadas após a transferência. As fitas aprovadas pelo CQ constituem o reativo R1, todos os outros reativos foram considerados como complementares, pois auxiliam na realização da reação de WB.

Conjugado imunoenzimático – Reativo R2

No preparo do Reativo R2, pronto para uso, foi utilizado conjugado enzimático anti-IgG humana marcado com peroxidase, diluente de conjugado e Bronidox L5 0,1%.

Assim, a cada novo lote de membranas produzidas, o conjugado foi titulado a 1/300, 1/500 e 1/1000 utilizando três amostras de soros padrão

positivo e um negativo, pertencentes ao grupo 1. Conjugado referência foi ensaiado em paralelo para validar a reação.

O conjugado foi preparado no título definido e foi ensaiado por **WB Tp-IgG**, para se verificar o perfil de reatividade com as amostras de soros padrão.

Diluyente de amostras de soros – Reativo R3

Para o preparo do diluyente de amostras de soros, inicialmente, foi titulado o *sorbent*, que corresponde a um decocto de cultura de *Treponema phagedenis*, biotipo *Reiter*, não-patogênico em meio rico em peptídeos e soro animal. Cada novo lote deve ser centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos, filtrado em algodão e acrescido de azida sódica 0,1% e ser titulado a 1/0,5, 1/1, 1/2 e 1/3, com amostras de soros que apresentaram reação inespecífica quando ensaiadas pela reação de FTA sem *sorbent*.

Após a definição do título de uso, o *sorbent* foi incorporado ao diluyente conforme determinado na padronização: a 500 mL de tampão PBS 0,01 M, pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw), leite desnatado a 2,0%, foi adicionado 500 mL de *sorbent*. Ao volume final foi adicionado Bronidox L5 a 0,1%.

O diluyente de amostras de soro preparado foi ensaiado por **WB Tp-IgG**, para se verificar o perfil de reatividade encontrado após a fabricação, com quatro amostras de soros padrão positivo e um negativo. Diluyente referência foi ensaiado em paralelo para validar a reação. Também

foi realizada a dosagem de proteínas pelo método Bio-Rad Dc em duplicata e teste de esterilidade.

Soros controle negativo e positivo - Reativos R4 e R5.

As amostras de soros selecionadas para constituírem o controle de qualidade do kit devem respeitar os seguintes critérios: volume, perfil de reatividade para sífilis e doenças infecto-contagiosas.

No preparo de amostras de soros controle, o volume a ser produzido foi uma das primeiras preocupações. Na formatação do kit **WB Tp-IgG** foi utilizado 0,5 mL para cada controle negativo e positivo. Em um lote com 36 kits esse volume foi de 20 mL, no lote composto por 108 kits esse volume foi de no mínimo 60 mL, para cada amostra de soro selecionada.

As amostras de soros são processadas a partir de bolsas de sangue de doadores de sangue que foram recusadas para a seleção por serem reagentes para anticorpos anti *T. pallidum* e foram doadas ao laboratório. Essas bolsas de sangue foram recalificadas com Cloreto de Cálcio (CaCl₂) a 2,77% e dializadas contra PBS 0,01 M pH 7,2 e acrescidas do conservante glicerina a 50%, Bronidox 0,1% e azida sódica 0,1%. As amostras devem ser obrigatoriamente não reagentes para anticorpos anti HIV-1 e HIV-2, anti HCV (hepatite C) e antígeno HBs (hepatite B). Foi realizado teste de esterilidade em caldo TSB.

Foi selecionado como controle positivo, soro reagente para os testes de TPHA e FTA-abs, com perfil de reatividade de sífilis secundária por **WB Tp-IgG** e, como controle negativo, soro não reagente para testes

treponêmicos e não treponêmicos.

Solução cromogênica – Reativos R6 e R7

Para o preparo do reativo R6, foi pesado 1,05 g do sal 4-cloro- α -naftol (4CN - Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), transferido para becker de 500 mL, que foi solubilizado com 350 mL de metano (Merck), o becker foi coberto com parafilme e a solução foi deixada sob agitação por 15 minutos. Posteriormente, foi transferida para frasco tipo Schott de 500 mL, envolto em papel alumínio para evitar a incidência da luz e conservado em quarentena na geladeira 5 ± 2 °C até ser avaliado pelo CQ.

Para o preparo do diluente de 4-cloro- α -naftol, a 1996 mL do tampão PBS 0,01M, pH 7,2, foi adicionado 2,0 mL de Peridrol 30 V (Merck) e 2,0 mL de Bronidox L5 1,0%. A solução foi deixada sob agitação por 15 minutos, foi conferido o pH da solução. Esta foi transferida para frasco tipo Shott de 2000 mL, envolto em papel alumínio para evitar a incidência da luz e conservado em quarentena na geladeira 5 ± 2 °C até ser avaliado pelo CQ.

Os reativos foram ensaiados com duas amostras de soro padrão positivo e um negativo, com membrana de nitrocelulose e solução cromogênica referência foi avaliada em paralelo.

Solução de lavagem – Reativo R8.

A solução de lavagem foi preparada 20 vezes concentrada, constitui uma solução de PBS 0,2 M pH 7,2. Foi preparado 2 litros de PBS, pesando-

se 350,4 g de cloreto de sódio, 43,16 g de fosfato dissódico e 13,25 g de dihidrogenofosfato de sódio em beakers até completar o volume para 2 litros.

Foi controlado o pH da solução pronta para uso. E o perfil de reatividade com duas amostras de soros padrão positivo e um negativo, diluídas á 1/100 em fitas de nitrocelulose foram comparadas com reativo R8 referência.

3.5. Desenvolvimento do reagente *WB Tp-IgG* na forma de um kit diagnóstico.

Para o desenvolvimento de um reagente de diagnóstico, é preciso que todos os reagentes necessários a sua execução tenham sido aprovados pelo CQ e estejam disponíveis em volumes suficientes ao número de testes propostos. A instrução para uso do reagente deve ser objetiva e simples de ser executada, incluindo leitura e interpretação dos resultados.

Todos os reativos que fazem parte do ***WB Tp-IgG***, foram avaliados pelo controle de qualidade e apresentaram padrão de reatividade semelhante ao reagente referência.

No modelo proposto para o ***WB Tp-IgG***, os reativos que compõem o reagente estão descritos segundo sua composição, apresentação e volume ou quantidade fornecidos.

Reativo R1 - 30 fitas de nitrocelulose contendo proteínas do antígeno *TpZw* de *T. pallidum* separadas imunoeletroforéticamente de acordo com sua massa molecular e transferidas para membrana de nitrocelulose. Pronto

para o uso.

Reativo R2 – 34 mL de conjugado enzimático anti-IgG humana peroxidase, aliquotado em dois frascos de 17 mL. Pronto para uso.

Reativo R3 – 34 mL de solução diluente de soros. Pronto para uso.

Reativo R4 – 0,5 mL de soro controle negativo. Diluir á 1/100 na hora do uso.

Reativo R5 – 0,5 mL de soro controle positivo. Diluir á 1/100 na hora do uso.

Reativo R6 – 6,0 mL de cromógeno aliquotado em dois frascos contendo 3,0 mL cada. Preparar no momento do uso, conforme instruções da bula.

Reativo R7 – 34 mL de diluente de 4-cloro- α -naphtol. Preparar no momento do uso, conforme instruções da bula.

Reativo R8 – 34 mL de solução de lavagem 20 vezes concentrada que deve ser diluída em água antes de ser utilizada. Preparar no momento do uso, conforme instruções da bula.

3.5.1. Instruções para o uso e interpretação dos resultados do *WB-TplgG*

As instruções para a realização dos procedimentos de execução do teste de ***WB-TplgG*** foram descritas em forma de bula e fazem parte do reagente, Anexo E. As determinações da ANVISA da RDC 206 e 210 foram utilizadas como referência na redação da bula.

3.5.2. Preparo do kit *WB Tp-IgG*

Foram separados os reagentes que compõem um kit e desses, dois foram destinados ao controle de qualidade. Um dos quais foi colocado em estufa a 37 °C para a realização do controle da estabilidade acelerada por 7 e 15 dias. E o outro foi conservado em geladeira 5 ± 2 °C para realização dos testes em paralelo com o reagente em estufa e um reagente referência.

3.5.3. Controle global do kit *WB Tp IgG*.

No controle global, foram ensaiadas fitas de nitrocelulose ***WB Tp-IgG*** com cinco amostras de soro padrão positivo, uma amostra negativa pertencentes ao painel de CQ – Sífilis e os soros controles negativo R4 e positivo R5, com todos os reagentes que compõe o produto em comparação a um reagente referência. Foi considerado aprovado o lote fabricado que apresentou perfil de reatividade semelhante ao reagente referência.

3.5.4. Controle de estabilidade do kit *WB Tp IgG*.

No controle de estabilidade, 8 amostras de soros padrão positivos e 4 negativos pertencentes ao painel de CQ – Sífilis, do grupo G1, foram avaliadas com o reagente colocado em estufa à 37 °C, por 7 dias e 15 dias em paralelo com reagente referência. A análise é feita individualmente para cada fita.

Quando o reagente conservado em estufa à 37 °C por 7 dias apresenta o mesmo perfil de reatividade que reagente conservado em geladeira, foi possível estabelecer validade teórica de 6 meses. E, quando não se observa

alteração do perfil de reatividade para o reagente conservado em estufa a 37 °C por 15 dias, foi possível estabelecer validade teórica de 12 meses.

No entanto, é aconselhável que a validade também seja acompanhada em tempo real no tempo zero, após 6 meses, 12 meses, 18 meses e 24 meses.

No decorrer do processo pudemos acompanhar a validade em tempo real para o reagente **WB Tp-IgG** preparado por 24 meses.

3.6. Análise estatística

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficiência serão calculados de acordo com procedimentos descritos por Galen & Galbino, 1975 e o intervalo de confiança de acordo com o método descrito por Rothman & Boice, 1982.

4. RESULTADOS

4.1 Industrialização do **WB Tp-IgG**

4.1.1. Controle de qualidade do extrato antigênico de *Treponema pallidum*

A concentração de proteínas do extrato antigênico de *T. pallidum*, obtido a partir de 100 testículos de 50 coelhos, previamente selecionados pela quantidade de treponemas viáveis foi de 3,86 mg/ml (BioRad Dc Protein Assay Reagent). O volume final de 30,0 ml, forneceu uma concentração protéica total de 115,8 mg de extrato antigênico de *T. pallidum*, quantidade suficiente para a fabricação de oito (8) sublotes do reagente **WB Tp-IgG**. A validade do extrato antigênico, determinada em tempo real foi definida em 5 anos, quando mantido a -80°C.

A avaliação da qualidade do extrato antigênico de *Tp-Zw* foi feita por SDS-PAGE com coloração pelo método da prata e por *Western blotting* (WB) usando um soro padrão positivo e conjugado enzimático anti-IgG humana.

Nas Figuras 1 e 2 apresentamos os resultados obtidos.

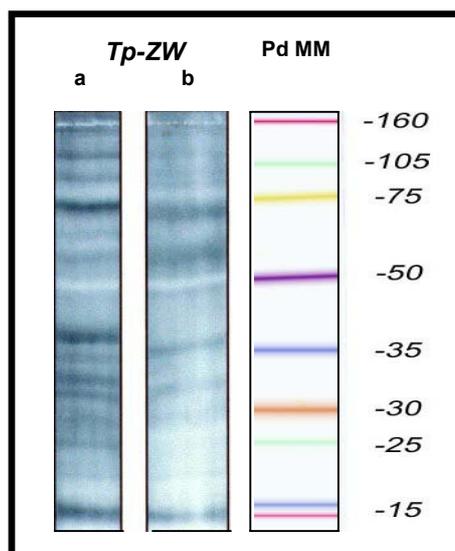


Figura 1 – Padrão de corrida eletroforética do extrato antigênico de *T.pallidum* após extração com detergente Zwittergent (*Tp-ZW*). *Tp-ZW a* - extrato em controle de qualidade, *Tp-ZW b* – extrato referência e Pd MM - Padrão de Massa Molecular (*Full range rainbow, Amershan*).

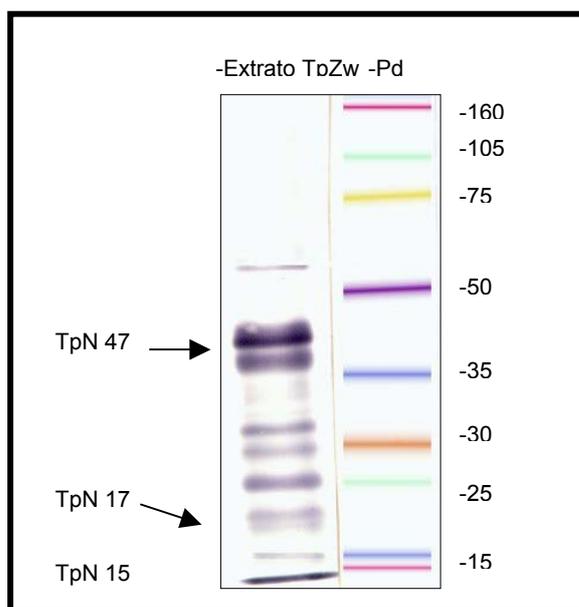


Figura 2 – Perfil de reatividade do extrato antigênico de *T.pallidum* (*TP-ZW*) por WB na presença de amostra de soro padrão positivo para sífilis e Pd MM - Padrão de Massa Molecular (*Full range rainbow, Amershan*).

Como podemos observar o perfil de reatividade obtido mostra as regiões protéicas correspondentes a região de TpN 47 a TpN 15 conservadas e bem definidas.

4.1.2. Controle de qualidade das fases de industrialização do SDS-PAGE e *Western blotting*

Todo o processo de industrialização de SDS-PAGE e *Western blotting* foi rigorosamente controlado. Os protocolos de trabalho criados foram cuidadosamente preenchidos com as referências, lote e validade de cada sal utilizado. Todas as soluções preparadas foram controladas e seus valores registrados quanto ao pH, temperatura e data de validade. Após a identificação, as soluções foram armazenadas em ambientes apropriados para utilização.

O controle do SDS-PAGE foi feito visualmente para a verificação de bolhas e uniformidade de distribuição nas placas de vidro. Géis com bolhas, ondas ou retração nas laterais próximas ao espaçador foram recusados.

A primeira etapa de controle de qualidade das fitas de nitrocelulose foi visual e realizada após o corte das fitas. Foram consideradas aprovadas as fitas que apresentavam identificações (numeração) bem definidas, sem enrugamento ou quebra.

O controle imunológico do WB realizado pelo controle das fitas A, B, C, D, E, F com amostra de soro padrão positivo, diluído a 1/100, mostrou homogeneidade na corrida eletroforética e qualidade na transferência das proteínas, sem bolhas que pudessem interferir nos resultados e intensidade de reação semelhante ao kit de referência, ensaiado em paralelo. Os resultados das leituras foram registrados em fichas apropriadas.

Esse controle realizado em todas as membranas mostrou um rendimento

de 78% e 90% durante o processo de industrialização, conforme demonstrado na Tabela 2.

Para avaliação da intensidade da reação das diferentes regiões protéicas, foram utilizados soros com diferentes perfis sorológicos que reagiram com as fitas selecionadas dos tubos 1A, 18A e 36A, representativos de todo o procedimento de industrialização. Os resultados das leituras foram registrados em fichas apropriadas.

Nas figuras 3 apresentamos a homogeneidade e o perfil de reatividade das diferentes fitas avaliadas.

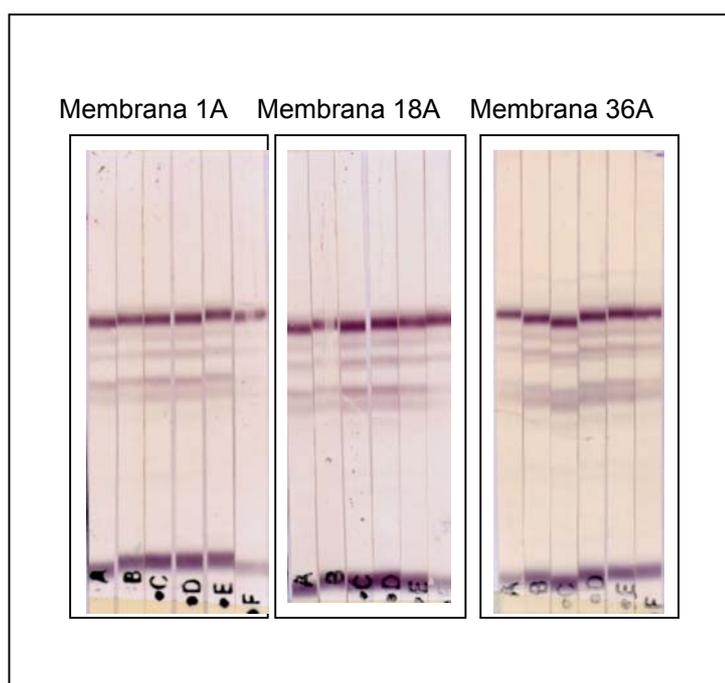


Figura 3: Homogeneidade da membrana com fitas A, B, C, D, E e F, avaliadas com soro padrão positivo diluído a 1/100 e membrana referência.

Quando as fitas avaliadas apresentaram o mesmo padrão de reatividade observado com o kit referência. O sub lote fabricado foi considerado aprovado e destinado à fabricação dos kits.

Após aprovação do número de fitas, foi definido o número de kits produzidos. As fitas constituem o reativo R1 do kit **WB Tp-IgG**.

Na Tabela 2, apresentamos o número total de reagentes produzidos na industrialização do **WB Tp-IgG** e as porcentagens de rendimento do processo.

Tabela 2: Etapas da fabricação do reagente **WB Tp IgG**.

| Nº produzido | | Géis preparados | Membranas obtidas | % de rendimento* | Fitas obtidas | Reagentes | | Nº teste obtidos |
|--------------|-----------|-----------------|-------------------|------------------|---------------|-----------|----------|------------------|
| Lotes | Sub-lotes | | | | | Obtidos | Para CQ | |
| 1º lote | 1 | 36 | 28 | 78 | 840 | 28 | 4 | 720 |
| 2º lote | 2 | 72 | 65 | 90 | 1950 | 65 | 7 | 1740 |
| Total | 3 | 108 | 93 | - | 2790 | 93 | - | 2460 |

• - % de Rendimento = (nº de géis preparados/nº de membranas obtidas) x 100

4.1.3. Controle de qualidade dos reativos complementares para composição do reagente **WB Tp-IgG**.

Conjugado imunoenzimático – Reativo R2

Após a titulação do conjugado imunoenzimático anti-IgG humana-peroxidase, foi definida a diluição de uso de 1/500.

Nessa diluição, as fitas de nitrocelulose ensaiadas com amostras de soros padrão apresentaram o mesmo perfil de reatividade observado com conjugado referência, Figura 4.

Os resultados das leituras foram registrados em fichas apropriadas.

Soros controle negativo e positivo - Reativos R4 e R5.

O soro controle positivo reagente para os testes de TPHA e FTA-abs apresentou forte reatividade reconhecendo os antígenos correspondentes as proteínas correspondentes as bandas de TpN 47, 17 e 15 do extrato *Tp-Zw*, constituindo o Reativo R4.

O soro controle negativo não reagente para testes treponêmicos e não treponêmicos apresentou ausência de bandas quando reagiu com fitas de nitrocelulose do **WB *Tp-IgG***.

O controle de esterilidade demonstrou ausência de crescimento em meio de cultura TSB. Os resultados foram registrados em fichas apropriadas, Figura 5.

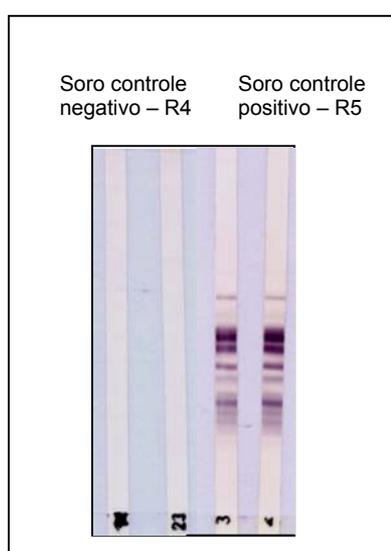


Figura 5: Perfil de reatividade de amostras de soros controle negativo R4 e positivo R5, preparados para o kit WB *Tp-IgG*, ensaiado com fita referência e teste.

Solução cromogênica – Reativos R6 e R7

As duas soluções foram preparadas isoladamente e, no momento do uso, foi realizado o preparo da solução cromogênica misturando 2 ml de reativo R6 (4-cloro- α -naftol em solução) com 10 ml de R7 (solução diluente de 4-cloro- α -naftol).

A solução cromogênica foi considerada aprovada quando fitas de nitrocelulose ensaiadas com amostras de soros padrão apresentaram o mesmo perfil de reatividade observado com solução referência.

Os resultados foram registrados em fichas apropriadas.

Solução de lavagem – Reativo R8

No controle de qualidade do Reativo R8, a solução preparada foi diluída 20 vezes com água destilada.

Foi realizada a avaliação do pH da solução, que forneceu valores de $7,2 \pm 0,05$.

A solução de lavagem foi considerada aprovada quando fitas de nitrocelulose ensaiadas com amostras de soros padrão apresentaram perfil de reatividade semelhante ao observado com solução de lavagem referência.

Os resultados foram registrados em fichas apropriadas.

4.1.4. Desenvolvimento do reagente **WB Tp-IgG**

No Quadro 1 e Figura 6 apresentamos o protótipo da composição do reagente **WB Tp-IgG**, composto por oito (8) reativos. Acompanha o reagente bula com as instruções de manipulação e interpretação dos resultados e quatro (4) barquinhas de oito canaletas cada, para a realização dos ensaios.

Quadro 1: Composição do reagente **WB Tp-IgG**.

| Reativo | Descrição do reativo | Apresentação | Quantidade ou volumes fornecidos |
|---------|---|--|----------------------------------|
| R 1 | Fitas contendo proteínas do antígeno Tp-ZW de <i>T. pallidum</i> separadas imunoeletroforéticamente de acordo com sua massa molecular, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e conservadas com 0,1% de bronidox L5. As fitas são numeradas sequencialmente. | Pronto para uso. | 30 fitas |
| R 2 | Conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase em tampão PBS 10mM pH7,2, contendo proteínas estabilizadoras, 0,2% de fenol e 0,001% de mercuriothiolate de sódio como conservantes. | Pronto para uso | 2x 17 ml |
| R 3 | Solução diluente de amostras. Tampão PBS 10mM pH 7,2, tween 200,05%, leite desnatado 1,0% sorbent 50%, contendo 0,1% de bronidox L5 como conservante. | Pronto para uso. | 34 ml |
| R 4 | Soro controle negativo. Soro humano negativo para anticorpos anti <i>T. pallidum</i> , contendo 0,1% de bronidox L5 e glicerina vol/vol como conservantes. | Diluir no momento do teste. | 0,5 ml |
| R 5 | Soro controle positivo. Soro humano positivo para anticorpos anti <i>T. pallidum</i> , contendo 0,1% de bronidox L5 e glicerina vol/vol como conservantes. | Diluir no momento do teste. | 0,5 ml |
| R 6 | Cromógeno: solução 3,36mM de 4-cloro- α -naphtol em solução alcoólica. Não contém conservantes. | Preparar no momento do uso | 2 x 3,0 ml |
| R 7 | Diluente de 4-cloro- α -naphtol: tampão PBS 10mM pH 7,2, contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio e 0,1% de bronidox L5 como conservante. | Preparar no momento do uso | 34 ml |
| R 8 | Solução de lavagem. Quando diluída é constituída de tampão PBS 10mM pH 7,2, Tween 20 0,05%. Não contém conservantes. | 20 vezes concentrada. Preparar no momento do uso | 30 ml |

* * Soros humanos não reagentes para anticorpos anti HIV-1 e HIV-2, anti HCV (hepatite C) e antígeno HB . Conservar a 2-8 °C até a data do vencimento indicada na etiqueta da caixa.

Apresentamos na Figura 6 o protótipo do formato do reagente **WB Tp-IgG**

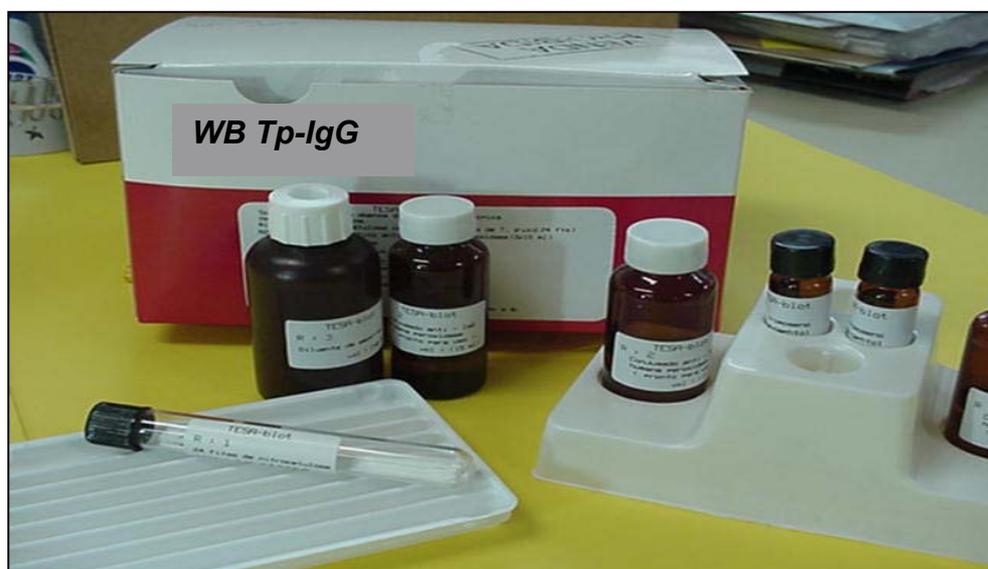


Figura 6: Protótipo do reagente **WB Tp-IgG** formatado para ser utilizado em avaliações internas e externas.

Controle global do kit *WB Tp-IgG*

No controle global do reagente foram ensaiadas fitas de nitrocelulose **WB Tp-IgG** com cinco amostras de soros padrão positivos e uma amostra negativa pertencentes ao painel de CQ – Sífilis e os soros controles negativo R4 e positivo R5. O reagente em controle apresentou perfil de reatividade semelhante ao referência, ensaiado em paralelo e registrados em fichas apropriadas.

Controle da estabilidade do kit *WB Tp-IgG*.

A estabilidade foi avaliada com reagente em estufa a 37°C, por 7 dias e 15 dias mostrou igual reatividade quando comparado com referência. Nestas

condições a estabilidade foi estimada em 12 meses, quando conservado a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$., resultados observados na Figura 7.

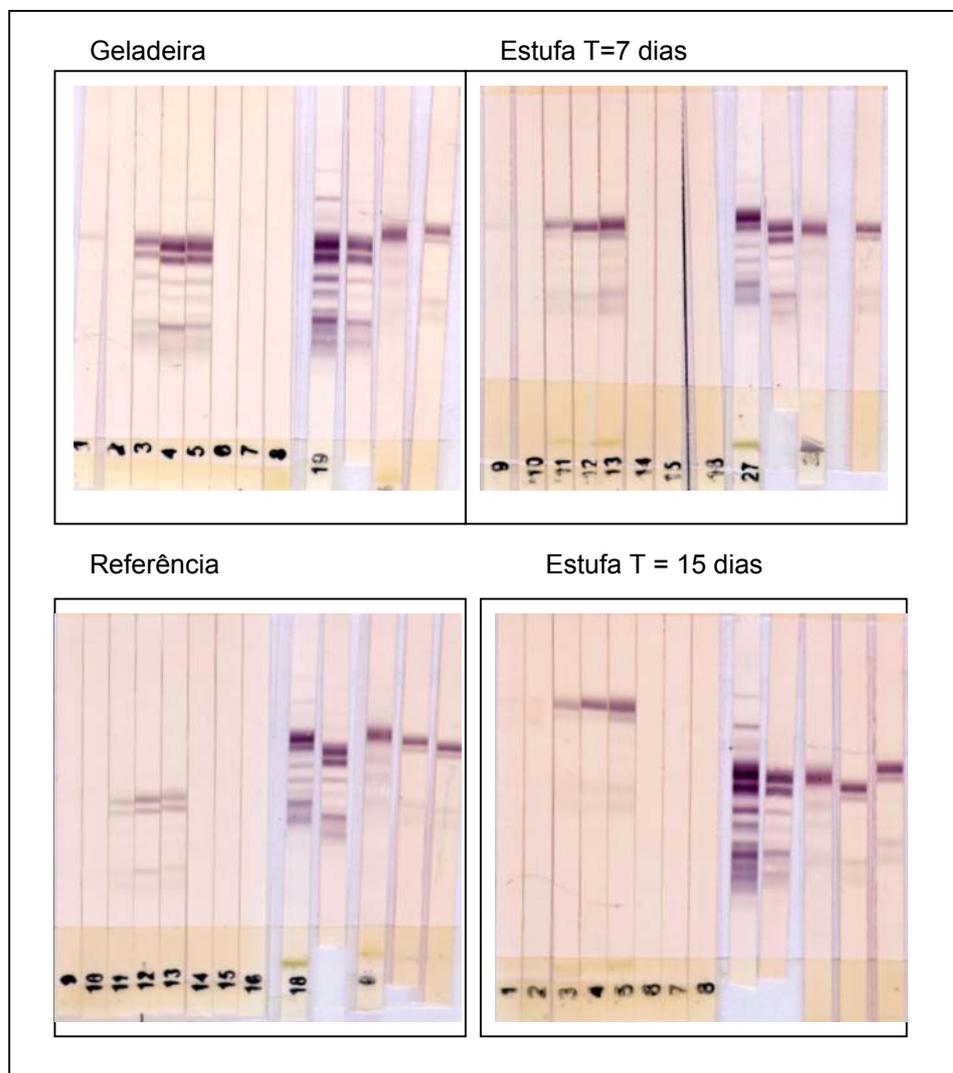


Figura 7: Resultados da estabilidade quando se avaliou o reagente por 7 e 15 dias em Estufa 37°C em comparação ao produto conservado em geladeira e um reagente referência.

Como podemos observar o perfil de reatividade do reagente preparado após ser conservado por 7 e 15 dias em estufa à 37°C não mostrou alteração, mesmo com amostras de soros de baixa reatividade.

No decorrer do processo acompanhamos a validade do reagente em tempo real. No tempo igual a zero, após 6 meses, 12 meses, 18 meses e 24

meses da data de fabricação. Não observamos variação na reatividade das amostras de soros ensaiadas no decorrer do processo, estabelecendo a validade em tempo real para o produto em 24 meses.

4.2. Aplicação do *WB Tp-IgG*

Soros de gestantes atendidas durante o pré-natal no Hospital Universitário Gaffrèe e Guinle (UNI-RIO) e na Maternidade Pro-Matre (SUS), da cidade do Rio de Janeiro.

As 175 amostras de soros foram obtidas de gestantes na primeira consulta do exame pré-natal e submetidas à triagem para sífilis pelo VDRL. Na Tabela 3 apresentamos os resultados obtidos em titulação seriada dos soros.

Tabela 3: Titulação seriada das 175 amostras de soros de gestantes, por VDRL.

| VDRL quantitativo | Nº de soros reagentes | (%) |
|--------------------------|------------------------------|--------------|
| 1:1 | 44 | 25,1 |
| 1:2 | 40 | 22,9 |
| 1:4 | 40 | 22,9 |
| ≥1:8 | 51 | 29,1 |
| TOTAL | 175 | 100,0 |

A titulação seriada dos soros mostra que 70,9% das amostras apresentam baixos títulos (1:1, 1:2 e 1:4) e 29,1% altos títulos \geq 1:8 para o VDRL.

Após a triagem inicial das gestantes pelo VDRL, para avaliar o valor clínico dos resultados obtidos, todos os soros foram processados pelos testes treponêmicos de hemaglutinação e ELISA, qualitativos.

Na Tabela 4, apresentamos os resultados obtidos, considerando a diluição de 1/80 dos soros para o teste de hemaglutinação e a amostra diluída a 1/4 no ensaio ELISA associados com os resultados do VDRL quantitativo.

Tabela 4: Resultados dos testes de TPHA, ELISA e a distribuição dos títulos por VDRL, em 175 amostras de soros de gestantes.

| Testes treponêmicos | | VDRL Quantitativo | | | | Total | Relativo (%) |
|---------------------|-------|-------------------|-----|-----|------------|-------|--------------|
| TPHA | ELISA | 1/1 | 1/2 | 1/4 | \geq 1/8 | | |
| R | R | 36 | 34 | 35 | 46 | 151 | 86,29 |
| NR | NR | 6 | 5 | 4 | 5 | 20 | 11,43 |
| NR | R | 2 | 1 | 1 | 0 | 4 | 2,29 |

Os resultados da Tabela 4 mostraram discrepância entre os resultados dos testes treponêmicos (2,29%) e entre os testes treponêmicos e o VDRL (11,43%), representando 13,72% dos soros avaliados.

Para a confirmação dos resultados utilizamos o **WB Tp-IgG**, com as amostras de soros diluídas á 1/100. Na Tabela 5, apresentamos os resultados obtidos.

Tabela 5: Resultados dos testes de TPHA, ELISA, **WB Tp-IgG** e a distribuição dos títulos por VDRL, com 175 amostras de soros de gestantes.

| Testes treponêmicos | | | VDRL Quantitativo | | | | Total | Relativo (%) |
|---------------------|-----|-----------|-------------------|-----|-----|------|-------|--------------|
| TPHA | EIA | WB Tp-IgG | 1/1 | 1/2 | 1/4 | ≥1/8 | | |
| R | R | R | 36 | 34 | 35 | 46 | 151 | 86,29 |
| NR | NR | NR | 6 | 5 | 4 | 5 | 20 | 11,43 |
| NR | R | R | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1,71 |
| NR | R | NR | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0,57 |

Usando o **WB Tp-IgG** como método referência, obtivemos índices de sensibilidade de 100% e 98,05% e especificidade de 98,77% e 100% para os testes treponêmicos ELISA e hemaglutinação.

Os resultados da Tabela 5 mostraram que 21 amostras de soros selecionadas por VDRL (12,0%) apresentaram resultados falsos positivos biológicos (FPB), 15 entre as amostras de soros com baixos títulos, 5 entre as com altos títulos e uma amostra apresentou resultado reagente por EIA e título no VDRL de 1:4. Três amostras apresentaram resultados falsos negativos para o teste de hemaglutinação TPHA, sendo confirmadas como sífilis por **WB Tp-IgG**. À medida que a reatividade do VDRL aumenta a concordância entre esses testes passa a ser de 100%.

Soros de pacientes recém infectados com o vírus da imunodeficiência humana

Foi investigada a presença de anticorpos anti *T. pallidum* por testes treponêmicos de FTA-abs, TPHA e ELISA e anticorpos anti-cardiolipínicos por testes não-treponêmicos de VDRL qualitativo, nos soros de 156 pacientes recém-infectados pelo HIV.

Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados das 156 amostras de soros de pacientes recém infectados com HIV, para os testes de VDRL, TPHA, FTA-abs:

| Resultados | Teste não-treponêmico | Teste treponêmico | | |
|--------------|-----------------------|-------------------|------------|------------|
| | N (%) | N (%) | | |
| | VDRL | ELISA | TPHA | FTA-abs |
| Reagente | 20 (12,8) | 35 (22,4) | 36 (23,1) | 27 (17,3) |
| Duvidoso | 10 (6,4) | 1 (0,6) | 0 | 5 (3,2) |
| Não reagente | 126 (80,8) | 120 (76,9) | 120 (76,9) | 124 (79,5) |

Os resultados da Tabela 6 mostram discrepâncias acentuadas entre os testes treponêmicos e cardiolipínicos e entre os testes treponêmicos; o que dificultou a definição sorológica dos casos.

Para confirmar os resultados dos testes treponêmicos foi utilizado o **WB Tp-IgG**. Na Tabela 7 apresentamos o comportamento das 156 amostras em relação aos testes realizados.

Tabela 7: Resultados das 156 amostras de soros de pacientes recém infectados com HIV, para os testes de VDRL, TPHA, FTA-abs e **WB Tp-IgG**:

| Resultados | Teste não-treponêmico (%) | Teste treponêmico N (%) | | | |
|--------------|---------------------------|-------------------------|------------|------------|------------------|
| | VDRL | ELISA | TPHA | FTA-abs | WB Tp-IgG |
| Reagente | 20 (12,8) | 35 (22,4) | 36 (23,1) | 27 (17,3) | 37 (23,7) |
| Duvidoso | 10 (6,4) | 1 (0,6) | 0 | 5 (3,2) | 1 (0,6) |
| Não reagente | 126 (80,8) | 120 (76,9) | 120 (76,9) | 124 (79,5) | 118 (75,6) |

Os resultados mostram proximidade de reatividade entre os testes ELISA, TPHA e **WB Tp-IgG**, mas deixam dúvida na interpretação.

Para estudarmos o comportamento individual dos testes nas amostras de soros, combinamos os resultados obtidos e verificamos a reatividade. Os soros com resultados duvidosos foram agrupados como reagentes para a análise. O **WB Tp-IgG** foi utilizado como confirmatório para os demais testes. Na Tabela 8 apresentamos os resultados obtidos.

Tabela 8: Resultados das 156 amostras de soro nos testes sorológicos de VDRL, ELISA, TPHA, FTA-abs e *WB Tp-IgG*.

| VDRL | ELISA | TPHA | FTA-abs | <i>WB Tp-IgG</i> | Total | Relativo (%) |
|--------------|-------|------|---------|------------------|------------|--------------|
| NR | NR | NR | NR | NR | 114 | 73,1 |
| R | R | R | R | R | 25 | 16,0 |
| NR | R | R | R | R | 6 | 3,8 |
| R | NR | NR | NR | NR | 2 | 1,3 |
| NR | R | R | NR | R | 2 | 1,3 |
| R | R | NR | R | R | 1 | 0,6 |
| NR | R | NR | NR | NR | 2 | 1,3 |
| R | NR | R | NR | R | 2 | 1,3 |
| NR | NR | R | NR | R | 1 | 0,6 |
| NR | NR | NR | NR | R | 1 | 0,6 |
| TOTAL | | | | | 156 | 100,0 |

Analisando os dados da Tabela 8, 114 (73,1%) amostras de soros foram não reagentes e 25 foram reagentes em todos os testes treponêmicos e não treponêmicos realizados. O teste VDRL foi não reagente em seis (6) amostras de soros reagentes em todos os testes treponêmicos, outras duas (2) amostras foram FPB para o VDRL, resultado confirmado por todos os testes treponêmicos.

Nove (9) amostras apresentaram resultados discrepantes entre os testes treponêmicos. Os testes de FTA-abs e TPHA apresentaram resultados falsos negativos para duas (2) e uma (1) amostras de soros respectivamente. Uma (1) amostra de soro foi falso negativo para os testes de ELISA e FTA-abs.

Uma (1) amostra de soro apresentou reatividade apenas para o **WB Tp-IgG**.

Utilizando o **WB Tp-IgG** como confirmatório, 38 (24,6%) amostras foram consideradas como verdadeiros positivos, valor que se aproxima do critério de dois testes treponêmicos reagentes (23,7%) a exceção foi para uma (1) amostra de soro que apresentou resultado reagente apenas no **WB Tp-IgG**.

Os testes de hemaglutinação (TPHA), imunofluorescência (FTA-abs) e ELISA apresentaram sensibilidade de 97,3%, 86,5% e 91,89% e especificidade de 100%, 100% e 98,9%, respectivamente.

Soros de banco de sangue com resultados reagentes ou inconclusivos na sorologia convencional para sífilis

Fizemos um estudo conjunto com o grupo da PANEL para avaliar o comportamento do **WB Tp-IgG** em amostras de soros provenientes da rotina de banco de sangue.

Durante o período do estudo, 2990 doadores selecionados por critérios clínicos e epidemiológicos foram triados para sífilis por VDRL qualitativo e ELISA. Os resultados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados da triagem de doadores de sangue por ELISA₁ e VDRL.

| Resultado | VDRL N (%) | ELISA ₁ N (%) |
|--------------|--------------|--------------------------|
| Reagente | 20 (0,67) | 52 (1,74) |
| Não Reagente | 2970 (99,33) | 2938 (98,26) |
| Total | 2990 | 2990 |

A elevada discordância de resultados obtidos nos testes de triagem foi analisada por outros testes treponêmicos, incluindo um novo ELISA₂, nas 52 amostras reagentes pelo ELISA₁, tendo o **WB Tp-IgG** como método confirmatório. Nas Tabelas 10 e 11 apresentamos os resultados obtidos na análise total e individual das amostras de soros.

Tabela 10: Resultados dos testes de VDRL, ELISA₁ e ₂, FTA-abs, TPHA e **WB Tp-IgG**, em 52 amostras de soros selecionadas como reagentes para sorologia da sífilis em banco de sangue.

| Resultado | VDRL | ELISA ₁ | ELISA ₂ | FTA-abs | TPHA | WB Tp-IgG |
|---------------------|------|--------------------|--------------------|---------|------|------------------|
| Reagente | 20 | 52 | 42 | 25 | 33 | 33 |
| Não reagente | 32 | 0 | 10 | 27 | 19 | 19 |

Tabela 11: Análise combinada das 2990 amostras de soros nos testes sorológicos de VDRL, TPHA, ELISA₂ e **WB Tp-IgG**.

| VDRL | ELISA ₂ | FTA-abs | TPHA | WB Tp-IgG | Total | Relativo (%) |
|--------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|---------------|
| | | Não realizado | Não realizado | Não realizado | | |
| NR | NR | realizado | realizado | realizado | 2936 | 98,19 |
| R | R | R | R | R | 7 | 0,23 |
| R | R | NR | R | R | 1 | 0,03 |
| NR | R | R | R | R | 18 | 0,60 |
| NR | R | NR | R | R | 7 | 0,23 |
| NR | R | NR | NR | NR | 9 | 0,30 |
| R | NR | NR | NR | NR | 12 | 0,40 |
| Total | | | | | 2990 | 100,00 |

R = Reagente

NR = Não reagente

A reatividade observada nos testes não-treponêmicos em 20 (0,67%) das 2.990 amostras analisadas foi confirmada para apenas 8 (0,27%) amostras, sendo que 12 (0,40%) foram consideradas como FPB.

O ELISA₁ apresentou resultado reagente em 52 (1,74%) das 2.990 amostras analisadas, o que diferiu dos resultados obtidos com o ELISA₂ onde 42 (1,40 %) amostras foram reagentes.

As 42 amostras reagente pelo ELISA₂ foram submetidas aos testes FTA-abs, TPHA e **WB Tp-IgG** sendo que 9 (21,40%) foram negativas para os três testes, 8 (19,10%) foram positivas para o WB e TPHA e negativas para o FTA-abs e 25 (59,50%) foram positivas para os três testes.

Considerando o **WB Tp-IgG** como teste de referência, obtivemos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e

negativos para os testes treponêmicos. Foram considerados para o cálculo os resultados obtidos na repetição com o ELISA₂, Tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros sorológicos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VP+) e negativos (VP-), ao se avaliar 2990 amostras de soros nos testes de ELISA₂, FTA-abs e TPHA, utilizando o **WB Tp-IgG** como referência.

| Parâmetros | EIA | FTA-abs | TPHA |
|-----------------------|------------|----------------|-------------|
| | (%) | (%) | (%) |
| Sensibilidade | 100 | 75,8 | 100 |
| Especificidade | 99,7 | 100 | 100 |
| VP (+) | 78,6 | 100 | 100 |
| VP (-) | 100 | 99,7 | 100 |

Soros de laboratório clínico com resultados reagentes ou inconclusivos nos testes de RPR e ELISA

Em laboratórios de grande porte, a rotina para a sorologia da sífilis é feita por ELISA. Normalmente, os soros reagentes são processados por testes não-treponêmicos, para confirmação da atividade da doença.

Na Tabela 13 apresentamos os resultados obtidos junto ao laboratório em 67 amostras de soros reagentes por ELISA e introduzimos o **WB Tp-IgG** para confirmação dos resultados.

Tabela 13: Resultados obtidos ELISA em 67 amostras de soros reagentes para sorologia da sífilis em laboratório de análises clínicas e avaliadas por RPR.

| Resultados | RPR | ELISA | WB <i>Tp-IgG</i> |
|-------------------|------------|--------------|-------------------------|
| Reagente | 17 | 67 | 64 |
| Não reagente | 50 | 0 | 3 |

Os resultados apresentados na Tabela 13 mostraram elevada positividade no ELISA, confirmados posteriormente pelo **WB *Tp-IgG*** em 64 amostras de soros.

A análise da reatividade individual está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados dos testes de ELISA, RPR e **WB *Tp-IgG*** avaliados com 67 amostras de soros de pacientes encaminhados para sorologia da sífilis.

| ELISA | RPR | WB <i>Tp-IgG</i> | Total | Relativo (%) |
|--------------|------------|-------------------------|--------------|---------------------|
| R | R | R | 17 | 25,37 |
| R | NR | R | 47 | 70,15 |
| R | NR | NR | 3* | 4,48 |
| Total | | | 67 | 100 |

R = Reagente

NR = Não Reagente

* 2 amostras apresentam relação D.O./cut-off = fracamente reagente

Os resultados obtidos mostram sensibilidade de 100% para o ELISA com valor preditivo positivo de 95,52%, em decorrência de três (3) amostras

que foram consideradas como falsos positivos no ELISA. Para o cálculo do valor preditivo foram utilizadas as amostras de soros do grupo G6 não reagentes.

Como conduta do laboratório, os resultados obtidos pelo ELISA são classificados em reagentes quando a relação densidade óptica dividida pelo *cut-off* da reação ($D.O./cut-off$) $> 2,0$; não reagentes $D.O./cut-off < 1,0$ e fracamente reagentes $D.O./cut-off \geq 1,0$ e $\leq 2,0$. Como para o clínico não são fornecidos os valores das densidades ópticas, essa classificação, têm como objetivo fornecer uma idéia da reatividade apresentada pelas amostras de soros reagentes. Considerando essa classificação temos que 13 amostras de soros foram fracamente reagentes no teste imunoenzimático, destas 10 (76,9%) foram reagentes por **WB Tp-IgG**.

4.3. Proposição de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis.

Após analisarmos os resultados obtidos na triagem sorológica de pacientes dos diferentes grupos, por testes não-treponêmicos (grupos 2, 3 e 4) ou treponêmicos (grupos 3, 4 e 5) propomos a utilização do reagente **WB Tp-IgG**, como método confirmatório em algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis, Figuras 8 e 9.

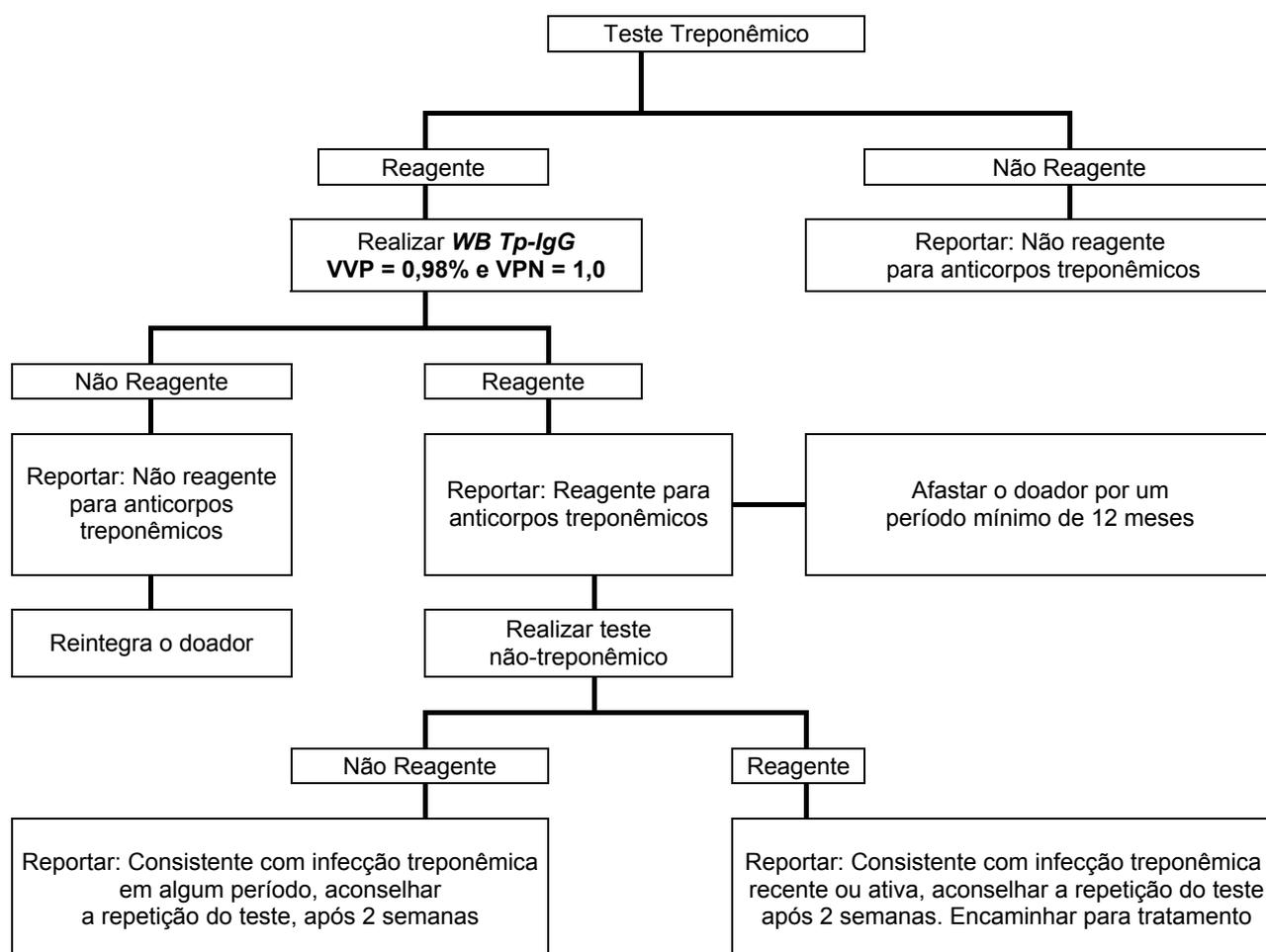


Figura 8: Proposição de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis – Utilizando teste treponêmico como modelo para a triagem inicial das amostras de soros.

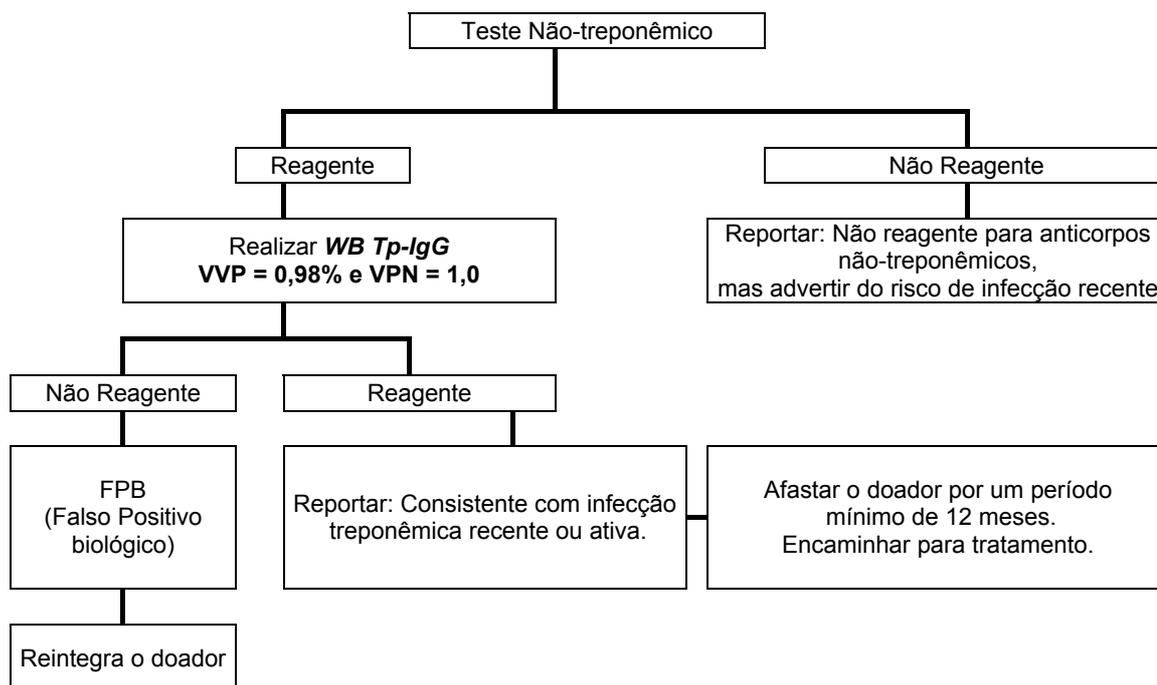


Figura 9: Proposição de algoritmo para o diagnóstico sorológico da sífilis – Utilizando teste não-treponêmico como modelo para a triagem inicial das amostras de soros.

5. DISCUSSÃO

A conduta na utilização de testes sorológicos para o diagnóstico da sífilis pode variar em função da população a ser estudada, principalmente entre doadores de sangue, gestantes e indivíduos pertencentes a grupos de risco.

No mundo, aproximadamente 80 milhões de doações de sangue são triadas anualmente para sífilis, 210 milhões de mulheres engravidam e um número não controlado de indivíduos de grupos de risco requerem a execução de testes para sífilis. A conduta tradicional é a triagem inicial por teste não-treponêmico, geralmente o VDRL e, a confirmação dos casos positivos ou duvidosos com testes treponêmicos (Peeling, 2004).

Nos Estados Unidos e alguns países da Europa os procedimentos epidemiológicos são baseados na identificação de indivíduos com a doença em atividade. Mesmo limitados em sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade os testes não-treponêmicos são recomendados.

Dos testes treponêmicos a reação de imunofluorescência indireta, FTA-abs, tem sido recomendada como referência e confirmatória na sorologia da sífilis (Larsen, 1995). A dificuldade de leitura e interpretação dos resultados e a baixa qualidade dos reagentes comerciais disponíveis, fez com que outros testes treponêmicos fossem utilizados como referência na sorologia da sífilis por apresentarem maiores índices de sensibilidade, sem a subjetividade da leitura do FTA-abs (Young, 1998; Schimit, 2000).

Atualmente com o aperfeiçoamento da qualidade dos testes treponêmicos, principalmente pela utilização de antígenos sintéticos e

recombinantes, existe uma mudança global na conduta da triagem sorológica da sífilis.

Testes treponêmicos imunoenzimáticos, automatizados, estão sendo usados na rotina dos bancos de sangue para triagem de doadores. Nos grandes serviços esse procedimento está adaptado para a automação simultânea de outros marcadores sorológicos para seleção de doadores, evitando o risco transfusional para hepatites, infecções pelo HIV e pelo HTLV e em alguns países para a doença de Chagas. Nos casos positivos nos testes treponêmicos recomenda-se o uso do VDRL ou RPR quantitativos para avaliar a atividade da doença (Young, 1997).

No Brasil o MS, faculta aos serviços de triagem a escolha do método treponêmico ou não-treponêmico que melhor se adapte as suas condições. A maioria dos serviços está utilizando ELISA, com antígenos recombinantes para triagem.

A elevada sensibilidade do ELISA tem ocasionada uma maior retenção de bolsas nos bancos de sangue. Embora esse fato seja indesejável, para a maioria dos serviços, a segurança dos resultados em selecionar população de risco, têm sido responsável pela melhor qualidade do sangue transfundido.

Segundo muitos autores, baseados na opinião de clínicos e laboratoristas, a necessidade atual é a de um teste que possa confirmar os resultados da triagem pelo ELISA, que fosse prático, de custo acessível e de fácil manipulação.

Foi nesse sentido que industrializamos o *Western blotting* para ser usado como confirmatório na sorologia da sífilis.

A industrialização das etapas de uma pesquisa é um processo difícil de ser executado dentro das normas estabelecidas pelas agências reguladoras dos países.

As empresas de biotecnologia, produtoras de reagentes para laboratórios, têm que seguir rigorosos critérios internos que vão desde a concepção do produto até a sua produção e externos referentes às normas vigentes para registros e comercialização.

Cabe a pesquisa estabelecer, após exaustivos estudos, todos os parâmetros exigidos para o produto, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade com amostras de soros bem definidas para que possa ser competitivo em nível internacional.

Cabe ainda a pesquisa procurar tornar o produto passível de industrialização, isto é, que todos os seus componentes sejam de fácil aquisição e manipulação.

Com os parâmetros bem definidos pela pesquisa inicia-se a fase de industrialização ou *“scaling up”* que significa a produção de lotes piloto, geralmente correspondendo a 20% do lote industrial. Nesta etapa todas as variáveis possíveis são controladas e o produto já na formatação de um reagente ou kit estará pronto para ser avaliado em estudos multicêntricos.

Claro está que os custos de produção estarão sendo avaliados para definição do custo/teste que deverá estar dentro das expectativas do marketing e em consonância com as exigências do mercado.

Definida a pesquisa e a industrialização o reagente é encaminhado para a produção. Se as etapas anteriores foram bem estudadas e padronizadas a produção será um sucesso, garantindo sua comercialização por período previamente projetado e estimado pelo marketing da empresa.

O nosso desafio neste trabalho foi mostrar que fitas de nitrocelulose contendo antígenos protéicos de *T. pallidum* obtidas pelo método de SDS-PAGE e *Western blotting* (WB), podem ser produzidas em escala maior, para obtenção de resultados reprodutíveis e confiáveis. Isto significa trazer para a universidade os conhecimentos da industrialização ou *scaling up*.

Para atingirmos nosso objetivo fizemos um detalhamento da industrialização de todo o processo, baseados na padronização do WB feita durante o ano de 2001-2002 e no aprendizado adquirido junto a empresa de biotecnologia.

Assim, foi definido o número de coelhos necessários para a obtenção de quantidade suficiente de treponemas que pudessem ser usados para a produção de pelo menos cinco lotes industriais. A qualidade do antígeno é um fator crítico na preparação do reagente.

Para garantir a qualidade do extrato antigênico selecionamos testículos que apresentavam de 80 a 100 treponemas por campo microscópico e que tivessem boa mobilidade. No começo do processo de preparação em larga escala, observamos baixo rendimento na obtenção dos treponemas, com perdas significativas por morte de coelhos, baixo número de treponemas viáveis ou contaminações secundárias. O rendimento do processo de obtenção de treponemas vai aumentando com o domínio da tecnologia de

inoculação e retirada de treponemas. Uma perda de 20% no número total de coelhos foi definida como aceitável e dentro dos custos previstos. Após a seleção dos treponemas foi produzido o extrato antigênico, utilizando o Zwittergent®, como detergente. De todos os agentes extratores estudados a qualidade de preparação com o Zw, detergente anfótero, que protege grupamentos químicos importantes das proteínas, foi a que melhores resultados apresentou (Lemos, 2002). Para garantir reprodutibilidade na preparação de fitas de nitrocelulose foi produzido uma quantidade de extrato antigênico que garantisse a produção de pelo menos cinco sublotes do reagente **WB Tp-IgG**.

A qualidade do extrato antigênico *Tp-Zw* foi rigorosamente avaliada por SDS-PAGE e WB, com soros, bem caracterizados, reagentes para as frações protéicas de 47kDa à 15kDa, região definida no nosso trabalho de grande importância na sorologia da sífilis (Lemos, et al., 2007).

Definido o antígeno foi feita a industrialização do SDS-PAGE e do WB. Essa é a etapa mais difícil da industrialização, que somente foi possível pela associação de conhecimentos da pesquisa com as necessidades de uma produção industrial.

Desenhar e dominar o processo, dispor de equipamentos necessários e matérias-primas de qualidade e trabalhar com protocolos escritos e bem definidos, são fatores que devem ser minuciosamente estudados e avaliados antes do início do processo. Normalmente as grandes empresas de biotecnologia possuem certificado de qualidade e boas práticas de fabricação.

Um ponto importante principalmente para matérias-primas importadas é dispor de soluções alternativas para eventuais interrupções no fornecimento, por falhas técnicas ou greves alfandegárias, etc. Nesse sentido sempre devemos ter matérias-primas alternativas e validadas, garantindo a continuidade e a qualidade da produção. Sem esse cuidado o risco de ter um produto final recusado pelo controle de qualidade chega a 90%.

Como descrito na metodologia e apresentado nos resultados conseguimos melhorar o rendimento da industrialização, após a fabricação do primeiro lote. Pontos críticos do processo industrial foram controlados, como o manuseio dos formadores de géis e câmaras de corrida eletroforética, onde a possibilidade de vazamentos são maiores e o tempo de corrida eletroforética, importante para as frações protéicas de baixo peso molecular.

O rendimento por nós obtido pode ser considerado muito bom. Em Cambridge, na preparação de *Western blotting* para a confirmação das infecções por HIV e HTLV a porcentagem de perdas, nessa fase, costuma ser superior a 40%, o que interfere diretamente no custo final do produto.

Produzido e controlado o reagente R1, fizemos os reativos complementares para a formatação de um reagente que pudesse ser usado, com facilidade em diferentes serviços.

Para isso foram preparados e controlados os demais reativos. Procuramos adequar os reativos para que fossem de fácil manipulação, evitando riscos de erros, principalmente de diluições. Assim, como pode ser

visto no quadro 1, a maioria dos reativos está pronta para ser utilizada por diferentes operadores, seguindo uma bula escrita de maneira clara e objetiva.

Nesse sentido ao prepararmos a bula, tivemos o cuidado de seguir normas internacionais e de orientar sobre a interpretação dos resultados e possíveis causas de erros na execução dos testes.

O protótipo do reagente chamado de **WB Tp-IgG**, composto por oito reativos, está completo para ser utilizado em qualquer serviço, contendo inclusive canaletas plásticas para colocação das fitas.

As informações dos usuários do produto, conseguidas por preenchimento de questionário de utilização do reagente, foram as mais elogiosas possíveis. Entre os pontos fortes do produto que foram mencionados, destacamos a robustez do reagente, facilidade de manipulação e leitura das reações.

Com o reagente **WB Tp-IgG** desenvolvido pudemos aplicá-lo nos diferentes grupos selecionados para o estudo. Analisando os resultados obtidos nos diferentes serviços constatamos a dificuldade que os clínicos e os laboratoristas enfrentam em sua interpretação utilizando os reagentes comerciais disponíveis.

Nas amostras de soros de gestantes, a triagem pelo VDRL mostrou sérios problemas de especificidade que poderiam comprometer a atuação do clínico junto a paciente e o feto. O elevado número de falsos resultados positivos em diferentes diluições do soro precisa ser cuidadosamente

analisado para a definição do valor clínico de um resultado positivo nos testes não-treponêmicos.

Quando utilizamos testes treponêmicos, mesmo de diferentes princípios observamos melhor uniformidade de resultados, porém com resultados inconclusivos que poderiam orientar o clínico na sua conduta, mas deixariam dúvidas sobre a necessidade de instituição de tratamento adequado.

Partindo do princípio que o método de WB, pelos elevados níveis de sensibilidade e especificidade, já observados anteriormente por Lemos em 2002, poderia ser utilizado como método confirmatório laboratorial da sífilis, fizemos sua aplicação e analisamos os resultados.

Das 175 amostras de soros reagentes no VDRL quantitativo 155 foram reagentes no ELISA e 151 no TPHA. No WB a reatividade foi observada em 154 amostras de soros.

Uma importante observação é que a maioria dos resultados falsos positivos no VDRL está concentrada nas diluições de 1/2 e 1/4 e nas amostras de soros não diluídas. Essa informação além das implicações clínicas tem importância epidemiológica, pois estariam sendo somados como casos de sífilis, no pré-natal, resultados incorretos.

A principal causa referida para esses falsos resultados é a dificuldade de leitura do VDRL para amostras de soros não diluídas. Outro ponto importante é que a grande maioria dos casos de sífilis, sorologicamente definidos eram de gestantes assintomáticas. Apenas 9% das gestantes, apresentavam sinais percebidos pelos clínicos.

Com o monitoramento das gestantes durante a gravidez e no pós-parto e com as informações epidemiológicas e clínicas obtidas dos prontuários das pacientes, tivemos a definição dos casos, comprovando a utilização do WB, como método confirmatório da sorologia convencional no grupo de gestantes estudadas.

Esses resultados tiveram ampla divulgação no meio científico, e a partir desse momento fomos procurados por muitos serviços para colaborar na investigação laboratorial de casos sorologicamente inconclusivos, reagentes ou de difícil interpretação.

Como já tínhamos industrializado o **WB Tp-IgG** e dispúnhamos do reagente para fazer grande rotina de amostras de soros aceitamos o desafio para comprovar a utilidade do reagente, como definido por nós anteriormente.

A importância da co-infecção sífilis-HIV não pode ser desprezada. O clínico deve buscar evidências confirmatórias para a doença em qualquer fonte disponível, incluindo a história do paciente, achados clínicos, exame direto de lesões e testes sorológicos, pois complicações como a neurosífilis podem ocorrer durante qualquer estágio da doença e essa associação pode conduzir a uma evolução agressiva e, por vezes, fulminante, das duas moléstias, trazendo grande preocupação à comunidade médica. O clínico deve estar sempre atento à possibilidade de re-infecção, reativação ou falha no tratamento anterior, critérios difíceis de serem estabelecidos em um paciente com HIV (Bolan, 1998). A proporção de co-infecção sífilis-HIV, varia dependendo da prevalência das infecções nas comunidades ou grupos

populacionais que serão estudados. Blocker, et al em 2000, fazendo uma meta análise, de estudos realizados em grupos populacionais dos EUA, detectaram soroprevalência de HIV em 15,7% dos pacientes infectados pelo *T. pallidum*, com maior predomínio entre os homens.

Lautenschlager, em 2006, relatou que o aumento significativo de sífilis entre homens heterossexuais está relacionado com o novo aumento da infecção pelo HIV em 20% ocorrido entre 1995 e 2000.

No Brasil, Rodrigues e Abatte em 2000, fazendo um estudo em Pernambuco relataram que a sífilis é a doença sexualmente transmissível mais prevalente nas infecções por HIV, 8,8% dos casos.

Hoje existe uma recomendação das autoridades de diferentes países para que todos os pacientes com sífilis sejam avaliados para a pesquisa do HIV e que todos os pacientes com HIV sejam avaliados para a pesquisa de anticorpos anti *T. pallidum* (Bolan, 1998, Ministério da Saúde, 2005).

Ao aplicarmos o reagente em uma coorte de pacientes recém infectados pelo HIV, que estão sendo cuidadosamente monitorados clínica e laboratorialmente, obtivemos reatividade em 24,3% das amostras de soros, concordando em 19,8% com os outros testes treponêmicos. Dos 38 pacientes com **WB Tp-IgG** reagente, 36 eram do sexo masculino e duas (2) do sexo feminino, com idade média de 36 anos. Dos pacientes com sexo masculino 32 eram homossexuais e 4 heterossexuais. As duas pacientes do sexo feminino apresentavam comportamento heterossexual.

Nesse grupo de pacientes o desempenho de **WB Tp-IgG** não está sendo analisado apenas pela porcentagem de positividade, mas também

pelo perfil de reatividade das bandas de proteínas correspondendo as regiões de TpN47, TpN17 e TpN15, conforme definido em trabalho publicado por Lemos et al., 2007. Essa possibilidade do WB pode ajudar na definição da época em que os pacientes adquiriram sífilis, o que tem significado epidemiológico especial.

Em nosso estudo uma das melhores aplicações do **WB Tp-IgG**, como confirmatório dos resultados obtidos em outros testes treponêmicos ou não, foi no grupo de doadores de sangue.

Em colaboração com PANEL – Assessoria e Controle de Qualidade, empresa especializada na avaliação de reagentes comerciais e nos serviços de laboratórios dos bancos de sangues do Brasil e América Latina, estudamos o comportamento do **WB Tp-IgG** em amostras de soros inconclusivas selecionadas de 2990 doadores de sangue que se apresentaram no serviço.

Dados não apresentados em nosso trabalho mostraram a intensa discrepância de resultados na avaliação de reagentes para a pesquisa de anticorpos não-treponêmicos. A triagem inicial pelo VDRL mostrou reatividade em 0,35% das amostras de soros com títulos variando de 1/1 até 1/32. Quando outros testes não-treponêmicos foram usados na triagem, observou-se intensa discordância de resultados variando de 4 a 20 o número de soros reagentes. Essa discordância deve-se fundamentalmente a qualidade, a apresentação do reagente e a dificuldade de discriminar o resultado positivo do negativo, principalmente nas amostras com baixos títulos no VDRL. Reagentes prontos para uso mostraram maior uniformidade

nos resultados do que os reagentes que foram preparados no laboratório, antes do início da rotina.

O ELISA recombinante também utilizado para triagem apresentou inicialmente positividade em 52 amostras, correspondente a uma retenção de 1,74% das bolsas de sangue. Um fator interessante na triagem nessa população foi a repetição do ELISA com reagentes de outro fabricante. Das 52 amostras, inicialmente reagentes, 42 foram repetidamente reagentes.

Nessas amostras repetidamente reagentes, aplicamos os testes treponêmicos TPHA, FTA-abs e **WB Tp-IgG**. Das 42 amostras de soros reagentes, nove (9) não foram reagentes em nenhum dos três testes, sugerindo que sejam falsos positivos. As outras 33 amostras foram confirmadas pelo WB e TPHA. O FTA-abs foi reagente em apenas 25 amostras de soros, o que limita a sua utilização como método confirmatório para sífilis embora seja recomendado pelo CDC (Larsen, et al., 1995; Schmidt, et al., 2000).

Neste estudo ficou claro que tanto o TPHA como o WB poderiam ser utilizados como confirmatórios, porém pelas qualidades já definidas o WB apresenta maior potencial para ser escolhido.

Completando a avaliação do **WB Tp-IgG** estudamos sua aplicação em laboratório clínico de grande porte, onde a rotina da sorologia para sífilis é feita pelo ELISA. Normalmente todos os resultados positivos pelo ELISA são processados por testes não-treponêmicos para verificação da atividade da doença e a resposta ao tratamento instituído.

O que nos chamou a atenção foi o elevado número de amostras de soros reagentes no **WB Tp-IgG** que concordaram com os resultados do ELISA. Das 67 amostras reagentes no ELISA, 64 foram reagentes no WB e apenas 17 reagentes no RPR. Dizer que todas as 47 amostras de soros não reagentes no RPR e reagentes no WB e ELISA são simplesmente cicatriz sorológica é um risco que tem que ser avaliado e devidamente equacionado. Provavelmente nessa população, que comparece nos laboratórios para repetição ou seguimento da doença, o estudo do perfil de proteínas seria de grande valor para orientar o clínico na sua conduta.

Tendo como base os resultados apresentados neste estudo, as informações dos usuários com relação ao reagente **WB Tp-IgG** e o domínio das etapas de industrialização, não temos dúvida em propor que o método de seja incluído no algoritmo de laboratório da sífilis, em substituição ao FTA-abs. Já foram numeradas algumas limitações do FTA-abs, mas a principal é que a fabricação desse produto, está sendo descontinuada na maioria das empresas, por entenderem que se trata de um produto manual, cuja vida média de utilização já atingiu o seu limite.

6. CONCLUSÃO

1. Foi industrializado o método de *Western blotting* com antígenos protéicos de *T. pallidum*, para obtenção de um reagente para ser utilizado na sorologia da sífilis.

2. A utilização do **WB Tp-IgG** como confirmatório da sífilis mostrou que existe uma intensa discrepância de resultados entre testes não-treponêmicos e entre testes treponêmicos, que deve ser cuidadosamente analisada e corrigida.

3. A proposta de um algoritmo tendo o **WB Tp-IgG** como método confirmatório da sorologia da sífilis, substituindo o FTA-abs, trará maior segurança na avaliação do valor clínico dos resultados obtidos.

7. ANEXOS

Anexo A: Critérios para definição de sífilis congênita

Portaria nº. 542, 22/12/86, D.O.U. 24/12/86, com revisão dos Comitês Assessores de Epidemiologia e de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Programa Nacional de DST/AIDS, 2003.

A sífilis congênita e a sífilis na gestação são doenças de notificação compulsória e investigação obrigatória. A sífilis adquirida deve ser notificada de acordo com as normas estaduais e/ou municipais.

A vigilância epidemiológica na sífilis tem como objetivo a detecção ativa e precoce dos casos de sífilis congênita para tratamento adequado das mães e crianças e adoção de medidas de controle visando sua eliminação; interromper a cadeia de transmissão da sífilis adquirida, com detecção e tratamento precoces dos casos e parceiros.

Após a revisão a principal modificação foi o agrupamento dos critérios da definição anterior em um único bloco, não mais utilizando a classificação final de confirmado, presumível ou suspeito. Assim todos os casos nos quais a definição se aplica serão notificados como casos de sífilis congênita. Portanto, para fins de vigilância epidemiológica, será considerado caso de sífilis congênita e assim deverá ser notificado:

1º Critério – Toda criança, aborto, ou natimorto de mãe com evidência clínica de sífilis e/ou com sorologia não-treponêmica reagente para sífilis com qualquer titulação, na ausência de teste confirmatório treponêmico realizado no pré-natal ou no momento do parto ou curetagem, que não tenha sido tratada ou tenha recebido tratamento inadequado.

2º Critério – Todo indivíduo com 13 anos de idade com as seguintes evidências sorológicas: titulações ascendentes (testes não-treponêmicos); e/ou testes não-treponêmicos reagentes após seis meses de idade (exceto em situações de seguimento terapêutico); e/ou testes treponêmicos reagentes após 18 meses de idade; e/ou títulos de anticorpos em teste não-treponêmico maiores do que os da mãe. Em todos os casos acima descritos, deve ser afastada a possibilidade de sífilis adquirida.

3º Critério – Todo indivíduo com menos de 13 anos, com teste não-treponêmico reagente e evidência clínica ou líquórica ou radiológica de sífilis congênita.

4º Critério – Toda situação de evidência de infecção por *T. pallidum* na placenta ou no cordão umbilical e/ou em amostras da lesão, biópsia ou necropsia de criança, produto de aborto ou natimorto, por meio de exames microbiológicos.

Anexo B - Comissões de éticas em pesquisa**APROVAÇÃO**

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 15.08.06, **APROVOU**, *ad-referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **170/04**, intitulado "Desenvolvimento de métodos imunológicos para o diagnóstico confirmatório da sífilis em suas diferentes fases clínicas", apresentado pela **ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **PROF. DR. ANTONIO WALTER FERREIRA**
Pesquisador(a) Executante: **DRA. ELAINE ANTUNES DE LEMOS**

CAPPesq, 15 de Agosto de 2006.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa



UNIVERSIDADE DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREE E GUINLE

MEMO CEP / N° 06/2004

Rio de Janeiro, 02 de abril de 2004

Ilmo.
Prof. Carlos Alberto Moraes e Sá
Disciplina de Clínica Médica

Conforme determinação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffree e Guinle, durante a reunião ordinária de 25 de março de 2004, o projeto **“Avaliação e aplicação de técnicas diagnósticas confirmatórias treponêmicas – WB (Western blotting), ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) e TPHA (Treponema pallidum hemagglutination), no diagnóstico da sífilis em gestantes no período pré-natal, com VDRL de baixa reatividade . “** foi aprovado do sob o ponto de vista da ética na pesquisa, conforme normas da Resolução 196 do Ministério da Saúde.

Atenciosamente

Marcus Vasconcellos
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa do HUGG

C/c

Pró-Reitoria de Pós-Graduação Pesquisa e Extensão
Arquivo da CEP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 29 de junho de 2005.
CEP 0919/01
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ESPER GEORGE KALLÁS
Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação da resposta imunológica em pacientes recentemente infectado pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio com estratégia de testagem dupla (detuned) (Versão de 31/Ago/2001)".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o(s) a(s) **Nova versão do protocolo, datada de 23/mar/2005** ao (do) projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."



Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenação de Desenvolvimento da Gestão Descentralizada – COGest
Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 27 de abril de 2005.

PARECER N°037/2005 – CEPSMS

Prezado (a) Senhor (a),

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo analisou, e **APROVOU**, de acordo com a Resolução CNS 196/96, Nova Versão, de 23 de março de 2005 do protocolo de pesquisa “*Avaliação da resposta imunológica do paciente recentemente infectado pelo HIV-1, identificado pela técnica sorológica de ensaio imunoenzimático com estratégia dupla (detuned).*” – Registro N°148/2003-CEP/SMS, de autoria do(a) pesquisador(a) **Esper Georges Kallás**.

Como procedimento adotado por este Comitê de Ética em Pesquisa, solicitamos a inclusão, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do seguinte: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – Rua General Jardim, 36 – 2º andar – Telefone: 3218-4043 – e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br.

Lembramos que este parecer não basta para que seu estudo possa se realizar dentro da unidade, é necessária também a permissão administrativa da autoridade sanitária.

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d)
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O relatório final deve ser apresentado ao CEP, logo que o estudo estiver concluído.

Atenciosamente,

ELIANA DE AQUINO BONILHA

Vice-Coordenadora do
Comitê de Ética em Pesquisa da
Secretaria Municipal da Saúde – CEPSMS

Ilmo(a). Sr(a).
Esper Georges Kallás
Nesta



Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenação de Desenvolvimento da Gestão Descentralizada – COGest
Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 04 de Dezembro de 2003

Ofício Nº 162/2003 – CEPSMS

Prezado Senhor,

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo analisou, e **APROVOU**, de acordo com a Resolução 196/96, o protocolo de pesquisa "Avaliação da resposta imunológica dos pacientes recentemente infectados pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio imunoenzimático com estratégia de testagem dupla (detuned) (versão de 31/08/2001)"; de autoria do pesquisador **Esper Georges Kallas**.

Como procedimento adotado por este Comitê de Ética em Pesquisa, solicitamos a inclusão, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do seguinte: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – Rua General Jardim, 36 – 2º andar – Telefone: 3218-4043 – e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br.

Lembramos que este parecer não basta para que seu estudo possa se realizar dentro da unidade, é necessária também a permissão administrativa da autoridade sanitária.

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d)
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões de descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando constar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. 196/96 CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O relatório final deve ser apresentado ao CEP, logo que o estudo estiver concluído.

Atenciosamente,

ELIANA DE AQUINO BONILHA

Vice-Coordenadora do
Comitê de Ética em Pesquisa da
Secretaria Municipal da Saúde – CEPSMS

Hmo. Sr
Esper Georges Kallas
Universidade Federal de São Paulo
Nesta.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de maio de 2003

CEP Nº 919/01

CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr.(a)

Pesquisador(a): ESPER GEORGE KALLÁS

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina

Ref.: Projeto de Pesquisa:

Avaliação da resposta imunológica em pacientes recentemente infectado pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio com estratégia de testagem dupla (detuned) (Versão de 31/Ago/2001)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU a(s) o(s):

Nova versão de protocolo (Versão de 02/dez/2002)

do projeto de pesquisa acima citado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de março de 2002

CEP Nº 919/01
CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr.(a)

Pesquisador(a): ESPER GEORGE KALLÁS

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina

Ref.: Projeto de Pesquisa:

Avaliação da resposta imunológica em pacientes recentemente infectado pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio com estratégia de testagem dupla (detuned) (Versão de 31/Ago/2001)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU a(s) o(s):

Nova versão de protocolo (Versão de 15/Jan/2001)

do projeto de pesquisa acima citado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 19 de outubro de 2001

CEP Nº 919/01

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): ESPER GEORGE KALLÁS

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina

Ref.: Projeto de Pesquisa

Avaliação da resposta imunológica em pacientes recentemente infectado pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio com estratégia de testagem dupla (detuned) (Versão de 31/Ago/2001)

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima.

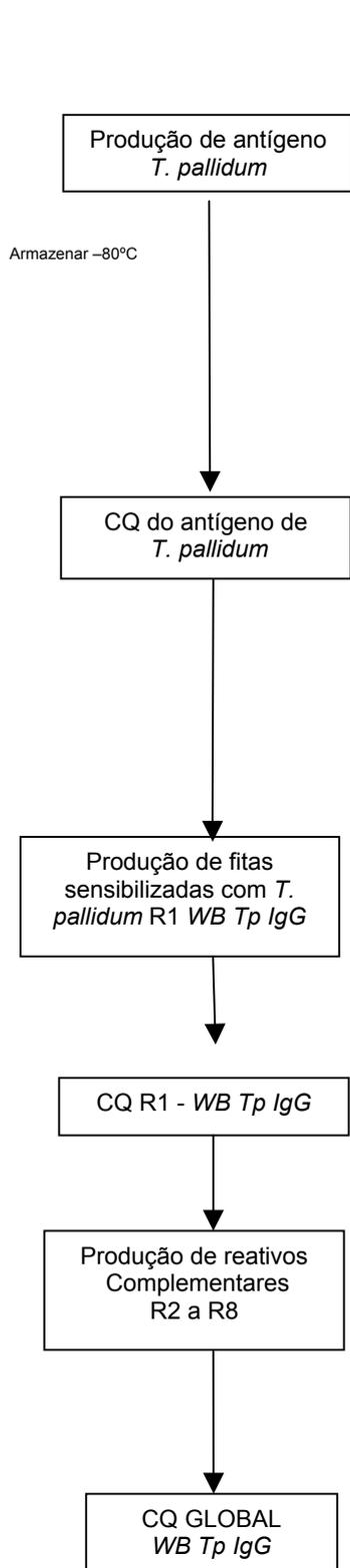
Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **17/04/02**

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Omar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo C - Fluxograma de Industrialização e CQ do WB Tp Ig



TÉCNICAS:

Manutenção de *T. pallidum* em testículos de coelhos.
Fabricação de extrato antigênico.
Técnicas de congelamento e reativação

EQUIPAMENTOS:

Biotério climatizado para manutenção de coelhos (infectados e sãos)
Fluxo Laminar
Cepa Nichols de *Treponema pallidum*
Armazenamento em N₂
Material de manipulação estéril

TÉCNICAS:

Produção de gel de SDS-PAGE e WB
Controle de Qualidade

EQUIPAMENTOS (BIORAD):

Corrida eletroforética Mini-Gel
Transferência para nitrocelulose
Fonte de eletroforese (POWER PAC 200)

TÉCNICAS DE FABRICAÇÃO:

R1 – Fitas de Nitrocelulose

EQUIPAMENTOS especificados ou equivalentes:

Gel Caster: Hoeffer Two Place Gel Casting Stand SE6015
3 Tanque de eletroforese: Hoeffer Electrophoresis Tank (12 géis) SE700
Fonte de Eletroforese: Amersham Pharmacia Biotech EPS1001
Tanque de Transferência: ISS Megadalt Tank
Estufa com ventilação
Cortador de tiras de nitrocelulose 3,5mm

TÉCNICAS DE CONTROLE DE QUALIDADE :

R1 a R8 e Controle Global

TÉCNICA DE FABRICAÇÃO

R2 – Conjugado Enzimático
R3 – Diluente de Amostra
R4 – Soro Controle Negativo
R5 – Soro controle Positivo
R6 – Cromógeno (4Cloro α Naphtol)
R7 – Solução Diluente de 4Cloro α Naphtol
R8 – Solução de Lavagem 20X concentrada

TÉCNICAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Dos reativos complementares R1 a R8 e Controle Global do reagente, incluindo estabilidade.

Anexo D: Esquema de obtenção do extrato antigênico de *T.pallidum*, Zwittergent (*Tp-Zw*).

Material inicial: 100 testículos de coelhos selecionados*

(lote padrão de trabalho)

*(com rendimento de 80 a 100 treponemas por campo microscópico).

Extrato *TpZW*^a

Ressuspender os sedimentos de *T. pallidum* com 3,0ml PBS + 1mM PMSF

⇓¹

Acrescentar 300µl PBS Zw 10%

⇓

Adicionar 5,5ml PBS + 1mM PMSF

⇓²

Repetir o procedimento de ¹ a ² por mais quatro vezes

⇓

Observar ao microscópio, campo escuro, ausência de grumos e treponemas íntegros.

⇓

Centrifugar a 18.000rpm, por 30min, a 4°C

⇓

Recuperar delicadamente o sobrenadante, desprezando o sedimento.

⇓

Diálisar o sobrenadante durante 24hs contra PBS (3 trocas)

⇓

Volume final = 30,0ml

⇓

Aliquotar em tubos Nalgem (5,0ml cada), bem identificados e congelar a -80°C

⇓

Realizar controle de qualidade (CQ) do extrato obtido.

Se liberado pelo CQ, estabelecer validade 5 anos à - 80°C.

^a**Extrato *TpZW*** = Extrato *T. pallidum* Zwittergent[®]

Anexo E: Procedimento para realização do teste “BULA”

WB Tp IgG

PRINCÍPIO DO TESTE:

Fitas de nitrocelulose contendo antígeno semipurificado de *T. pallidum* obtidos pela manutenção da bactéria em repiques sucessivos em testículos de coelhos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE seguido de transferência eletroforética para membrana de nitrocelulose, como descrito por LAEMMLI, 1970 e TOWBIM et al, 1978.

As fitas são incubadas com soros de pacientes com suspeita de sífilis. A reação antígeno anticorpo é evidenciada por conjugado enzimático anti-IgG humano peroxidase e solução cromógena 4-cloro- α -naphtol. A positividade do teste é verificada visualmente pela presença de bandas de proteínas do *T. pallidum* na região de TpN47, TpN17 e/ou TpN15. A reatividade pode ser para apenas uma dessas proteínas ou para a combinação das mesmas e deve ser comparada com padrão de reatividade fornecido por amostra de soro reagente para sífilis.

COMPOSIÇÃO DO KIT:

| Reativo | Descrição | Apresentação | Quantidade ou volumes fornecidos |
|---------|--|---|----------------------------------|
| R 1 | Fitas contendo proteínas do antígeno <i>T. pallidum</i> , separadas eletroforéticamente de acordo com sua massa molecular, transferidas para membranas de nitrocelulose, bloqueadas e conservadas com 0,1% de bronidox L5. As fitas são numeradas sequencialmente. | Pronto para uso. | 30 fitas |
| R 2 | Conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase em tampão PBS 10mM pH 7,2, contendo proteínas estabilizadoras, 0,2% de fenol e 0,0001% de mercurothiolate de sódio como conservantes. | Pronto para uso. | 2 x 17 ml |
| R 3 | Solução diluente de amostras. Tampão PBS 10mM pH 7,2, tween 20 0,05%, leite desnatado 1,0%, <i>sorbent</i> 50%, contendo 0,1% de bronidox L5 como conservante. | Pronto para uso. | 34 ml |
| R 4 | Soro controle negativo. Soro humano negativo para anticorpos anti <i>T. pallidum</i> , contendo 0,1% de bronidox L5 e glicerina vol/vol como conservantes. | Diluir no momento do teste. | 0,5 ml |
| R 5 | Soro controle positivo. Soro humano positivo para anticorpos anti <i>T. pallidum</i> , contendo 0,1% de bronidox L5 e glicerina vol/vol como conservantes. | Diluir no momento do teste. | 0,5 ml |
| R 6 | Cromógeno: solução 3,36mM de 4-cloro- α -naphtol em solução alcoólica. Não contém conservantes. | Preparar no momento do uso. | 2 x 3,0ml |
| R 7 | Diluente de 4-cloro- α -naphtol: tampão PBS 10mM pH 7,2, contendo 0,03% de Peróxido de hidrogênio e 0,1% de bronidox L5 como conservante | Preparar no momento do uso. | 34 ml |
| R 8 | Solução de lavagem. Quando diluída é constituída de tampão PBS 10mM pH 7,2, tween 20 0,05%. Não contém conservantes. | 20 vezes concentrado. Preparar no momento do uso. | 34 ml |

* Soros humanos não reagentes para anticorpos anti HIV-1 e HIV-2, anti HCV (hepatite C) e antígeno HBs. Conservar a 2-8 °C até a data do vencimento indicada na etiqueta da caixa. Esta data indica o limite para utilização dos componentes.

PROTOCOLO DE TESTES:**PREPARAÇÃO DOS REATIVOS (Os reativos devem estar à temperatura ambiente (20-25°C) no momento do uso)**

Solução cromógena (PREPARAR NO MOMENTO DO USO)

Misture 1 parte da solução R6 com 5 partes da solução R7.

Por exemplo: 1ml de R6 + 5ml de R7.

Solução de lavagem (R8)

Aquecer o frasco em banho-maria a 37°C por 15 minutos, agitando ocasionalmente para completa dissolução de cristais eventualmente formados. Diluir 20x com água destilada.

Por exemplo: 25ml de solução de lavagem 20x concentrada + 475ml de água destilada).

A solução diluída pode ser armazenada em geladeira (4°C) por 4 semanas.

PROCEDIMENTO (Seguir rigorosamente o protocolo indicado. O teste é processado à temperatura ambiente 20-25°C):**PREPARAÇÃO DAS TIRAS PARA REAÇÃO:**

Verificar o número de amostras a serem testadas para a execução dos testes.

OBSERVAÇÃO: Incluir os soros controle positivo (R4) e negativo (R5), que devem ser diluídos a 1/100 como as amostras a serem ensaiadas.

Estabelecer o plano de distribuição e identificação das amostras e dos soros controle (R4 e R5).

Acrescentar 1ml do diluente de amostras (R3) a cada canal onde realizará a reação.

Colocar as tiras de nitrocelulose individualmente em cada canal, utilizando pinça, com o número da tira para cima.

Incubar por 1 minuto até que as tiras estejam completamente umedecidas, em agitador de gangorra.

ADIÇÃO DA AMOSTRA:

- 1) Acrescentar 10 μ l da amostra a ser testada ou Soro Controle (R4 e R5) ao canal apropriado.
- 2) Incubar por 18 horas, em agitador tipo gangorra
- 3) Aspirar o conteúdo de cada canal.
- 4) Adicionar 1ml do tampão de lavagem (R8) e lavar por 5 minutos sob agitação, aspirando novamente. *
- 5) Repetir esse passo por mais 4 vezes.

* Para evitar contaminação entre os canais, não deixe que o tampão de lavagem transbordem.

ADIÇÃO DO CONJUGADO:

- 6) Acrescentar 1ml do conjugado anti IgG humano peroxidase (R2 - pronto para uso) a cada canal pré-estabelecido.
- 7) Incubar por 2 horas, em agitador tipo gangorra
- 8) Aspirar o conteúdo de cada canal.
- 9) Lavar como descrito nos itens 9 e 10.

ADIÇÃO DO SUBSTRATO:

- 1) Acrescentar 1ml da solução cromógena (previamente preparada conforme descrito no item 1 do Preparo de Reativos) a cada canal. Usar de preferência um repipetador automático para começar a reação ao mesmo tempo em todos os canais.
- 2) Incubar por exatamente 15 minutos, em agitador tipo gangorra.
- 3) Aspirar o conteúdo de cada canal.
- 4) Rinsar os canais com 2 breves lavagens com água destilada para interromper o desenvolvimento de cor.
- 5) Transferir as tiras, usando pinça, com o número voltado para cima, para um papel toalha ou papel de filtro e deixar secar ao ar livre. Não faça interpretação de resultados até que as tiras estejam totalmente secas.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS:**VALIDAÇÃO DO TESTE:**

Comparar o resultado obtido com o soro controle positivo e a fita referência da planilha de resultados, o soro controle negativo não apresenta bandas reagentes na região indicada.

Colar as fitas de nitrocelulose na planilha de resultados. Posicionando-as para que os números finais fiquem alinhados à direita com a fita referência.

Comparar as bandas de proteínas das fitas com a fita referência.

Verificar a presença de bandas anti *T. pallidum* na região TpN47, TpN17 e TpN15.

CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO:

REAÇÃO POSITIVA: Presença de bandas para qualquer uma das proteínas na região de Massa Molecular TpN47, TpN17 e TpN15.

REAÇÃO NEGATIVA: Ausência de bandas na região de Massa Molecular TpN47, TpN17 e TpN15.

Anexo F: Etapas do processo de produção do kit *WB Tp-IgG*

1) PREPARO DO REATIVO R1:

Fitas de nitrocelulose com antígeno *T. pallidum*

- | | |
|---|--|
| 1 | Preparo das soluções de trabalho |
| 2 | Preparo do gel para SDS-page |
| 3 | Corrida eletroforética SDS-page |
| 4 | Transferência para membrana de nitrocelulose |
| 5 | Identificação e controle de qualidade das fitas produzidas |

2) PREPARO DOS REATIVOS COMPLEMENTARES:

| | |
|------------|-----------------------------|
| Reativo R2 | Conjugado enzimático |
| Reativo R3 | Diluyente de amostras |
| Reativo R4 | Soro controle não reagente |
| Reativo R5 | Soro controle reagente |
| Reativo R6 | Cromógeno 4-cloro-1-naphtol |
| Reativo R7 | Diluyente do cromógeno |
| Reativo R8 | Solução de lavagem |

Anexo G: Amostras de soros do grupo G3 – Soros de pacientes recém infectados com o vírus HIV, com resultados positivos ou duvidosos nos testes treponêmicos e não-treponêmicos.

| Número | Sífilis (ELISA) | Positivos e duvidosos | | | |
|--------------|-----------------|-----------------------|--------------------|---------------|------|
| | | WB | VDRL(Puro e 1/10) | FTA-abs | TPHA |
| 8 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 13 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 14 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 15 | POS | POS | POS | 1+ (duvidoso) | POS |
| 16 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 22 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 24 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 25 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 26 | POS | POS | NEG | 1+ (duvidoso) | POS |
| 30 | POS | POS | NEG | 1+ (duvidoso) | POS |
| 43 | NEG | NEG | POS | NEG | NEG |
| 45 | POS | POS | NEG | POS | POS |
| 53 | POS | POS | NEG | POS | POS |
| 57 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 61 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 62 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 68 | POS | POS | POS | POS | NEG |
| 70 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 74 | POS | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 76 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 78 | POS | POS | NEG | POS | POS |
| 81 | NEG | POS | 2+ (duvidoso) | NEG | POS |
| 82 | NEG | POS | 2+ (duvidoso) | NEG | POS |
| 93 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 95 | NEG | NEG | POS | NEG | NEG |
| 96 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 100 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 101 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 102 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 105 | POS | POS | NEG | NEG | POS |
| 107 | inc | NEG | NEG | NEG | NEG |
| 111 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | 1+ (duvidoso) | POS |
| 116 | NEG | POS | NEG | NEG | POS |
| 119 | POS | POS | NEG | NEG | POS |
| 122 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 127 | POS | POS | NEG | 1+ (duvidoso) | POS |
| 128 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 135 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 149 | NEG | 2+ (duvidoso) | NEG | NEG | NEG |
| 153 | POS | POS | 2+ (duvidoso) | POS | POS |
| 155 | POS | POS | POS | POS | POS |
| 156 | POS | POS | POS | POS | POS |
| Número | Sífilis (ELISA) | WB | VDRL(Puro e 1/10) | FTA-abs | TPHA |
| Positivo | 35 | 37 | 20 | 27 | 36 |
| Inconclusivo | 1 | 1 | 10 | 5 | 0 |
| Negativo | 6 | 4 | 12 | 10 | 6 |
| Total | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 |

8. REFERÊNCIAS

Alderete JK; Freeman-Shade I, Baseman JB. Immunodiagnostic test for detection of serum antibody to *Treponema pallidum* (syphilis): fibronectin as a capture vehicle for treponemal adhesins. *J Imm Meth.* 1985;84:365-73.

Avelleira JCR; Bottino G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. *An Bras Dermatol.* 2006;81(2):111-126.

Backhouse JL; Nesteroff SI. *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-abs test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbio. Infect Dis.* 2001;39(i):9-14.

Baker-Zander SA; Hook III; Bonin P; Handsfield HH; Lukehart SA. Antigens of *T. pallidum* recognized by IgG and IgM antibodies during syphilis in humans. *J Infect Dis.* 1985;151: 267-72.

Blocker ME; Levine WC; St. Louis ME. HIV prevalence in patients with syphilis, United States. *Sex Transm Dis.* 2000;27:53-9.

Bolan, G. University of California San Francisco, Syphilis and HIV. HIV insite knowledge base chapter, may 1998.

Boletim Epidemiológico, Estado de São Paulo, CVE, ano VII, no. 1. Dezembro 2005

Byrne RE; Iaska S; Bell M; Larson D; Phillips J; Todd J. Evaluation of a *Treponema pallidum* western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microb.* 1992;jan:115-22.

Camargo ME. Sífilis. In Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001.p. 215-20.

Camargo ME; Ferreira AW; Rocca A; Belem ZR. Hemapallidum, reagente nacional para o teste treponêmico de hemaglutinação para a sífilis. Avaliação dos resultados. *Rev Bras Patol Clin.* 1987;23:42-5.

Castro R; Prieto ES; Santo I; Azevedo J; Exposto FL. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:250–3.

Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Clinical Practices Guidelines. Centers for Disease Control, 1991.

Centers for Disease Control and Prevention. National Center for HIV, STD, and TB prevention. Sexually transmitted diseases surveillance 2001; September 2002.

Clark EG, Danbolt N. The Oslo study of the natural course of untreated syphilis. An epidemiologic investigation based on a restudy of the Boeck–Bruusgaard material. *Med Clin North Am* 1964;48:613–623

Cummings MC, Lukehart SA, Marra C, et al. Comparison of methods for the detection of *Treponema pallidum* in lesions of early syphilis. *Sex Transm Dis*. 1996;23:366-9.

Daniels KC; Ferneyhough HS. Specific direct fluorescent antibody detection of *Treponema pallidum*. *Health Lab Sci*. 1977;14:164-71.

Deacon WE; Falcone VH; Harris A. A fluorescent test for treponemal antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;96:477-80.

Dettori G; Grillo R; Mora G; Cavalli A; et al. Evolution of western immunoblotting technique in the serological diagnosis of human syphilitic infections. *Eur J Epidemiol*. 1989;5:22-30.

Dilley JW, Klausner JD, McFarland W, Kellogg TA, Kohn R, Wong W, et al. Trends in primary and secondary syphilis and HIV infections in men who have sex with men – San Francisco and Los Angeles, California. 1998- 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004;53:575-8.

Ebel A; Vanneste I; cardinaels M; Sablon E; et al. Validation of the inno-lia syphilis kit as a confirmatory assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:215-9.

Egglestone SI; Tuner AJL. For the PHLS syphilis serology working group, serological diagnosis of syphilis. *Communicable disease and public health.* 2000; 3:158-62.

Eijk, r. V. W. Van; Wolters ECh; Tutuarima JA; Hische EAH; Bos JD; Trotsenburg I Van; et al. Effect of early and late syphilis on central nervous system: cerebrospinal fluid changes and neurological deficit. *Genitourin Med.* 1987;63:77-82.

Ferreira AW; Lemos EA; Belém ZR; Camargo ME. Padronização e avaliação do desempenho do reagente Hemapallidum, nova formulação, no diagnóstico sorológico da sífilis. *Laes & Haes.* 1997;abril/maio:80-8.

Fieldsteel AH; Cox DL; Moeckli RA. Further studies on replication of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture of sf1ep cells. *Infect Immun.* 1982;35:449-55.

Fitzgerald DW; Behets F; Preval J; Schulwolf I; Bommi V; Chaillet P. Decreased congenital syphilis incidence in Haiti's rural artibonite region following decentralized prenatal screening. *Am J Public Health.* 2003;93:444-6.

Fraser CM; Norris SJ; Weinstock GM, White O; et. al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science.* 1998;281:375-88.

Fujimura K; Ise N; Ueno E; Hori T; Fujii N; Okada M. Reactivity of recombinant *Treponema pallidum* (r-tp) antigens with anti-Tp antibodies in human syphilitic sera evaluated by ELISA. *J Clin Lab Anal.* 1997;11:315-22.

Galen RS; Gambino SR. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York, John Wiley, 1975.

Gerber A; Krell S; Morenz J. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology. *Immunobiology*.1997;196:535–49.

Golden MR; Marra CM; Holmes KK. Update on syphilis: resurgence of an old problem. *J Am Med Assoc*. 2003;290:1510-4.

Goh BT. Syphilis in adult. *Sex Transm Infect*. 2005;81: 448-52.

Hanff PA; Miller JN; Lovett MA. Molecular characterization of common treponemal antigens. *Infect Immun*. 1983;40:825.

Harris A; Rosemberg AA; Del Vecchio ER. The VDRL slide micro flocculation test for syphilis using cardiolipin-lecithin antigen. *J Vener Dis Inform*. 1948;29:313-6.

Hensel U; Wellensiek HJ; Bhakdi S. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis immunoblotting as a serological tool in the diagnosis of infections. *J Clin Microbiol*. 1985;21:82-7.

Hopkins S, Lyons F, Coleman C, Courtney G, Bergin C, Mulcahy F. Resurgence in infectious syphilis in Ireland: an epidemiological study. *Sex Transm Dis*.2004;31:317-21.

Hunter EF; Deacon WE; Meyer PE. An improved test for syphilis- the absorption procedure (FTA-abs). *Public health Rep*. 1964;79:410-2.

Ijsselmuiden OE; Schouls LM, Stolz E; et al. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. *J Clin Microbiol*. 1989;27:152-7.

Kallas EG; Bassichetto KC; Oliveira SM; Goldenberg I; et al. Establishment of the serologic testing algorithm for recent human immunodeficiency virus (HIV) seroconversion (starhs) strategy in the city of São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004;8:399-406

Kellogg DSJr; Mothershed SM. Immunofluorescent detection of *Treponema pallidum*, a review. *JAMA*. 1969;5:938-45.

Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

Larsen SA; Farshy CE; Pender BJ; Adams MR; Petit DE; Hambie EA. Staining intensities in the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-abs) test: association with the diagnosis of syphilis. *Sex. Transm. Dis.* 1986;4:221-7.

Larsen SA; Steiner BM; Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:1-21..

Lautenschlager S. Diagnosis of syphilis: clinical and laboratory problems. *JDDG*. 2006; 1058-72.

Lemos EA Diagnóstico de laboratório da sífilis adquirida e congênita e definição das fases clínicas da doença por Western-blotting [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Lemos EA, Belem ZR, Santos A, Ferreira AW. Characterization of the *Western blotting* IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Mar 8; [Epub ahead of print]

Lewis IL; Taber IH; Baughn RE. Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol.* 1990; 2:296-302.

Lowry OH; Rosebrough D; Farr C; Randel RJ. Protein measure with the phenol reagent. *J. Bioch.* 1951;193:265-75.

Lynn WA; Lightman S. Syphilis and HIV: a dangerous combination. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:456-66.

Marcus U, Kollan C, Bremer V, Hamouda O. Relation between the HIV and the re-emerging syphilis epidemic among MSM in Germany: an analysis based on anonymous surveillance data. *Sex Transm Dis.* 2005;81:456-7.

Meyer MP; Eddy T; Baughn RE. Analysis of Western blotting (immunoblotting) technique in diagnosis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol.* 1994;32:629-33.

Musher, D.M., Baughn, N.E. Neurosyphilis in HIV – infected persons. *N. Engl. J. Med.*, 331: 1516-1517, 1994.

National Research Council – NCR. Nutrient requirements of rabbits. 2 ed. Washington: National Academy Press, 1977. 30p.

Nelson RA; Meyer, MM. Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J Exp Med.*, 1949;89:360-93.

Norris SJ. Syphilis. In Wright DM. Immunology of sexually transmitted diseases. Lancaster, England: MTP press Ltd.;1988.p.1-31.

Norris SJ and the *Treponema pallidum* polypeptide research group. Polypeptide of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Microbiol. Rev.* 1993;57:750-79.

Norris, S. J. & Larsen, S. A. *Treponema* and other host-associated spirochetes, p.636-651. In P. R. Murray, E.J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 1995. 6th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Norris SJ; Weinstock GM. The genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? *Curr Opin Infect Dis.* 2000;13:29-36.

Peeling RW; Hook III EW. The pathogenesis of syphilis: the great mimicker, revisited. *J Pathol.* 2006;208:224–32.

Peeling RW; Mabey D.; Fitzgerald DW; Watson-Jones D. Avoiding HIV and dying of syphilis. *Lancet*. 2004;364:1561-3.

Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998 D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de agosto de 1998. SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária.

Ramos JLA; Diniz EMA; Costa Vaz A. Sífilis congênita. In Diniz EMA; Costa Vaz A. Infecções congênitas e perinatais. 1a ed. São Paulo. Atheneu; 1991.

Rathlev T. Hemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* on the serodiagnosis of syphilis. *Br J Vener Dis*. 1967;43:181-5.

Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 343 – Regulamento técnico do Serviço de Hemoterapia de 13 de dezembro de 2002. D.O.U. 19.12/2002.

Resolução RDC nº 206 - Estabelece Regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu Registro, Cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Tecnologia de Produtos para Saúde de 17 de novembro de 2006. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 20 de novembro de 2006.

Resolução RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003 - Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução ANVISA - D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 14 de agosto de 2003.

Roahn PD. Autopsy studies in syphilis. US Public Health Service, Venereal Disease Division. *J Vener Dis Inf* 1947;21(Suppl).

Rockwell DH, Yobs AR, Moore MB. The Tuskegee study of untreated syphilis. The 30th year of observation. *Arch Intern Méd* 1964;114:792–798.

Rodrigues EHG; Abath FGC. Doenças sexualmente transmissíveis em pacientes infectados com HIV/AIDS no estado de Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33: 47-52.

Rodríguez I; Alvarez E.L; Fernández C; Miranda A. Comparison of a recombinant-antigen enzyme immunoassay with *Treponema pallidum* hemagglutination test for serological confirmation of syphilis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97:347-9.

Romanowski B; Forsey E; Prasad E; Lukehart S; Hook III EW. Detection of *Treponema pallidum* by a fluorescent monoclonal antibody. *Sex Transm Dis*. 1987;14:156-9.

Rothman, KJ; Boice, JD – Epidemiologic analysis with programmable calculator. Boston, 8 Epidemiology Resources. 1982 p:24-32,.

Salazar AJ; Perret CP; Chávez AP; García PC; Millán ZO; Goycoolea MM. Evaluación de métodos diagnósticos para sífilis congénita. *Rev Chil Infectol*. 2000;17:289-96.

Salazar JC; Hazlett KR; Radolf JD. The immune response to infection with *treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes Infect*. 2002;4:1133-40.

Sambri V; Maragoni A; Eyer C; Reichhuber C; et al. Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;534-9. .

Sanchez PJ; Mccracken JrGH; Wendel GD; Olsen K; et.al. Molecular analysis of fetal IgM response to *Treponema pallidum* antigens: implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. *J Infect Dis*. 1989;3:508-17.

Sanchez P; Wendel G. Syphilis in pregnancy. *Clin Perinat*. 1997;24:71-90.[medline].

Sato NS; Hirata MH; Hirata RD et al. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by Western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999;41:115-8.

Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Divisão de Doenças Sexualmente Transmissíveis/aids: relatório sífilis congênita. São Paulo, Centro de Documentação da Secretaria de Saúde, p.1-20, 1993.

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 6 ed rev. Brasília; Ministério da Saúde; 2005. p. 267-72.

Schimitz JL; Gertis KS; Mauney C; Stamm IV; Folds JD. Laboratory diagnosis of congenital syphilis by immunoglobulin m (igm) and iga immunoblotting. *Clin Diagn Lab Immuno*. 1994;1:32-7.

Schimid G. Economic and programmatic aspect of congenital syphilis prevention. *Bull WHO*. 2004;33:354-63.

Schmidt BL; Edjlalipour M; Lurger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1279-82.

Simms I; Fenton K, Ashton M; et al. The re-emergence of syphilis in the United Kingdom: the new epidemic phases. *Sex Transm Dis*. 2005;32:220-6.

Singh AE; Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. *Clin. Microbiol. Rev*. 1999;12:187-209.

Stamm LV. Biology of *Treponema pallidum*. In Holmes KK; Sparling PF; Mardh PA; et al. Sexually transmitted diseases. 3rd ed. New York. McGraw-Hill; 1999. p.467-72.

Tichonova L; Borisenko K; Ward H; Meheus A; Gromyko A; Renton A. Epidemics of syphilis in the Russian Federation: trends, origins, and priorities for control. *Lancet*. 1997;350:210-3.

Towbin N; Satehelin T; Bordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1979;76:43650-4

Travis P; Bennett S; Haines A; Pang T; Bhutta Z, Hyder AA, et al. Overcoming health-systems constraints to achieve the millennium development goals. *Lancet*. 2004;364:900–06.

Sambri V; Marangoni A; Simone MA; D'Antuono A; Negosanti M; Cevenini R. Evaluation of recomwell treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:200–05.^[u1]

Veldkamp J; Visser AM. Application of the enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of syphilis. *Br. J. Vener. Dis*. 1975;51: 227-31.

Watson-Jones D; Gumodoka B, Weiss H; et al. Syphilis in pregnancy in Tanzania. The effectiveness of antenatal syphilis screening and single-dose benzathine penicillin treatment for the prevention of adverse pregnancy outcomes. *J Infect Dis*; 2002;186:948–57.

World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Who: geneva, WHO/HIV AIDS/2001.02.

Young H; Walker PJ; Merry D; Soufflet L. A preliminary evaluation of prototype western blot confirmatory test for syphilis. *Int. J. Std Aids*. 1994;5:409-14.

Young H. Syphilis - serology. *Dermatologic Clinics*. 1998;16:691-8.

Zrein M; Maure I, Boursier F, Soufflet L. Recombinant antigen based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antibodies in blood bank routine. *J Clin Microbiol.* 1995;33:525–7.

Zoelchiling N; Schluepen E; Soyers H. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol.* 1997;136:683-6. [medline].

9. APÊNDICE

Tabelas de contingência

Grupo 2: Soros de gestantes atendidas durante o pré-natal no Hospital Universitário Gaffrèe e Guinle (UNI-RIO) e na Maternidade Pro-Matre (SUS), da cidade do Rio de Janeiro N = 175.

| Testes não-treponêmicos | | | Testes treponêmicos | | | | | |
|--------------------------------------|-------------|------------|---------------------|-----------|------------|-----------|------------------|-----------|
| VDRL quantitativo | TOTAL N (%) | | TPHA | | ELISA | | WB <i>Tp-IgG</i> | |
| | | | R | NR | R | NR | R | NR |
| G 7: Grupo de amostras não reagentes | 60 | 25,5 | 0 | 60 | 0 | 60 | 0 | 60 |
| 1/1 | 44 | 18,7 | 36 | 8 | 38 | 6 | 38 | 6 |
| 1/2 | 40 | 17 | 34 | 6 | 35 | 5 | 35 | 5 |
| 1/4 | 40 | 17 | 35 | 5 | 36 | 4 | 35 | 5 |
| ≥1/8 | 51 | 21,7 | 46 | 5 | 46 | 5 | 46 | 5 |
| Total | 235 | 100 | 151 | 84 | 155 | 80 | 154 | 81 |

R = Reagente

NR = Não Reagente

Tabelas de contingência

Considerando o grupo G7

| Diagnóstico sorológico da sífilis | | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|------------|-------------------------|-------|-------|-------|
| | | Positivas em 2 testes treponêmicos | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- |
| TPHA | Positivo | 151 | 0 | 151 | 98,05 | 100 | 100 | 96,43 |
| | Negativo | 3 | 81 | 84 | | | | |
| | Total (n) | 154 | 81 | 235 | | | | |
| EIA | Positivo | 154 | 1 | 155 | 100 | 98,77 | 99,35 | 100 |
| | Negativo | 0 | 80 | 80 | | | | |
| | Total (n) | 154 | 81 | 235 | | | | |
| WB <i>Tp-IgG</i> | Positivo | 154 | 0 | 154 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Negativo | 0 | 81 | 81 | | | | |
| | Total (n) | 154 | 81 | 235 | | | | |

Testes de validade: S (Sensibilidade), E (Especificidade), VP+ (Valor preditivo positivo), VP- (Valor preditivo negativo).

Considerando o grupo G7

| Diagnóstico sorológico da sífilis | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | WB <i>Tp-IgG</i> reagente | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- | |
| TPHA | Positivo | 151 | 0 | 151 | 98,05 | 100 | 100 | 96,43 |
| | Negativo | 3 | 81 | 84 | | | | |
| | Total (n) | 154 | 81 | 235 | | | | |
| ELISA | Positivo | 154 | 1 | 155 | 100 | 98,77 | 99,35 | 100 |
| | Negativo | 0 | 80 | 80 | | | | |
| | Total (n) | 154 | 81 | 235 | | | | |

Testes de validade: S (Sensibilidade), E (Especificidade), VP+ (Valor preditivo positivo), VP- (Valor preditivo negativo).

Grupo 3: Soros de pacientes recém infectados com o vírus da imunodeficiência humana (N = 156)

| Diagnóstico sorológico da sífilis | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | Positivas em 2 testes treponêmicos | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- | |
| ELISA | Positivo | 34 | 2 | 36 | 91,89 | 98,32 | 94,44 | 97,50 |
| | Negativo | 3 | 117 | 120 | | | | |
| | Total (n) | 37 | 119 | 156 | | | | |
| FTA-abs | Positivo | 32 | 0 | 32 | 86,49 | 100 | 100 | 95,97 |
| | Negativo | 5 | 119 | 124 | | | | |
| | Total (n) | 37 | 119 | 156 | | | | |
| TPHA | Positivo | 36 | 0 | 36 | 97,30 | 100 | 100 | 99,17 |
| | Negativo | 1 | 119 | 120 | | | | |
| | Total (n) | 37 | 119 | 156 | | | | |
| WB Tp-IgG | Positivo | 37 | 1 | 38 | 100 | 99,16 | 97,37 | 100 |
| | Negativo | 0 | 118 | 118 | | | | |
| | Total (n) | 37 | 119 | 156 | | | | |

Testes de validade: S (Sensibilidade), E (Especificidade), VP+ (Valor preditivo positivo), VP- (Valor preditivo negativo).

| Diagnóstico sorológico da sífilis | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-------|--------|--------|-------|
| | WB Tp-IgG como confirmatório | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- | |
| ELISA | Positivo | 34 | 2 | 36 | 89,47 | 98,31 | 94,44 | 96,67 |
| | Negativo | 4 | 116 | 120 | | | | |
| | Total (n) | 38 | 118 | 156 | | | | |
| FTA-abs | Positivo | 32 | 0 | 32 | 84,21 | 100,00 | 100,00 | 95,16 |
| | Negativo | 6 | 118 | 124 | | | | |
| | Total (n) | 38 | 118 | 156 | | | | |
| TPHA | Positivo | 36 | 0 | 36 | 94,74 | 100,00 | 100,00 | 98,33 |
| | Negativo | 2 | 118 | 120 | | | | |
| | Total (n) | 38 | 118 | 156 | | | | |

Testes de validade: S (Sensibilidade), E (Especificidade), VP+ (Valor preditivo positivo), VP- (Valor preditivo negativo).

Grupo 4: Soros de banco de sangue com resultados reagentes ou inconclusivos N = 54.

| | | Analisando as 54 amostras de soros | | | | | | | |
|--|------------------|---|------------------|------------------|--------------------------------|----------|------------|------------|--|
| Diagnóstico sorológico da sífilis | | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | | |
| | | Positivas em 2 testes treponêmicos | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- | |
| ELISA | Positivo | 33 | 9 | 42 | | | | | |
| | Negativo | 0 | 12 | 12 | 100 | 57,14 | 78,57 | 100 | |
| | Total (n) | 33 | 21 | 54 | | | | | |
| FTA-abs | Positivo | 25 | 0 | 25 | | | | | |
| | Negativo | 8 | 21 | 29 | 75,76 | 100 | 100 | 72,41 | |
| | Total (n) | 33 | 21 | 54 | | | | | |
| TPHA | Positivo | 33 | 0 | 33 | | | | | |
| | Negativo | 0 | 21 | 21 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| | Total (n) | 33 | 21 | 54 | | | | | |
| WB Tp-IgG | Positivo | 33 | 0 | 33 | | | | | |
| | Negativo | 0 | 21 | 21 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| | Total (n) | 33 | 21 | 54 | | | | | |

| | | Analisando com as 2990 amostras de soros | | | | | | | |
|--|------------------|---|------------------|------------------|--------------------------------|----------|------------|------------|--|
| Diagnóstico sorológico da sífilis | | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | | |
| | | Positivas em 2 testes treponêmicos | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- | |
| EIA | Positivo | 33 | 9 | 42 | | | | | |
| | Negativo | 0 | 2948 | 2948 | 100 | 99,70 | 78,57 | 100 | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | | |
| FTA-abs | Positivo | 25 | 0 | 25 | | | | | |
| | Negativo | 8 | 2957 | 2965 | 75,76 | 100 | 100 | 99,73 | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | | |
| TPHA | Positivo | 33 | 0 | 33 | | | | | |
| | Negativo | 0 | 2957 | 2957 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | | |
| WB Tp-IgG | Positivo | 33 | 0 | 33 | | | | | |
| | Negativo | 0 | 2957 | 2957 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | | |

Analisando com as 2990 amostras de soros

| Diagnóstico sorológico da sífilis | | Amostras de soros | | | Testes de validade* (%) | | | |
|-----------------------------------|-----------|---|-----------|-----------|-------------------------|-------|-------|-------|
| | | <i>WB Tp-IgG</i> como confirmatório | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- |
| EIA | Positivo | 33 | 9 | 42 | 100 | 99,70 | 78,57 | 100 |
| | Negativo | 0 | 2948 | 2948 | | | | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | |
| FTA-abs | Positivo | 25 | 0 | 25 | 75,76 | 100 | 100 | 99,73 |
| | Negativo | 8 | 2957 | 2965 | | | | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | |
| TPHA | Positivo | 33 | 0 | 33 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | Negativo | 0 | 2957 | 2957 | | | | |
| | Total (n) | 33 | 2957 | 2990 | | | | |

Grupo 5: Soros de laboratório clínico com resultados reagentes ou inconclusivos N = 67.

| Diagnóstico sorológico da sífilis | | Considerando o grupo G7 | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|---|-----------|-----------|-------------------------|-------|-------|--------|
| | | Amostras de soros reagente por <i>WB Tp-IgG</i> | | | Testes de validade* (%) | | | |
| | | Positivas | Negativas | Total (n) | S | E | VP+ | VP- |
| ELISA recombinante | Positivo | 64 | 3 | 67 | 100,00 | 95,24 | 95,52 | 100,00 |
| | Negativo | 0 | 60 | 60 | | | | |
| | Total (n) | 64 | 63 | | | | | |

Apêndice – Marcador de Massa Molecular

1 - O marcador de massa molecular (MM) utilizado foi o padrão FULL RANGE RAINBOW™ (Amersham Life Science, England HP7 9NA) onde mistura de proteínas recombinantes coloridas produzem bandas com coloração de igual intensidade e mesma localização quando separadas em gel de poliacrilamida como descrito por LAEMMLI, 1970, SCHAGGER & von JAGOW, 1987, SWANK & MUNKRES, 1971, WEBER & OSBORN, 1969. As massas moleculares e respectivas cores foram definidas pelo fabricante: Azul (250kDa), Vermelho (160kDa), Verde (105kDa), Amarelo (75kDa), Rosa (50kDa), Azul (35kDa), Laranja (30kDa), Verde (25kDa), Azul (15kDa), Vermelho (10kDa).