

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Avaliação do Uso de Teste Treponêmico Imunoenzimático Competitivo na
Triagem Sorológica da Sífilis em 23.531 Soros de Uma População de Baixa
Prevalência.**

MARIA LUIZA BAZZO

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Prof. Dra. Yoshimi Imoto Yamamoto

São Paulo

1999

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bazzo, Maria Luiza

B364a Avaliação do uso de teste treponêmico imunoenzimático competitivo na triagem sorológica da sífilis em 23.531 soros de uma população de baixa prevalência / Maria Luiza Bazzo. -- São Paulo, 1999.

99p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Yamamoto, Yoshimi Imoto

1. Sorologia 2. ELISA: Teste imunoenzimático : Medicina
3. VDRL : Diagnóstico de laboratório I. T. II. Yamamoto,
Yoshimi Imoto, orientador.

615.37 CDD

MARIA LUIZA BAZZO

**Avaliação do Uso de Teste Treponêmico Imunoenzimático
Competitivo na Triagem Sorológica da Sífilis em 23.531 Soros de
Uma População de Baixa Prevalência.**

Comissão Julgadora
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientadora
Profa. Dra. YOSHIMI IMOTO YAMAMOTO

1º Examinador
Profa. Dr. MAURÍCIO ALCHORNE

2º Examinador
Profa. Dra. SUMIE H. SHIMIZU

São Paulo, 30 de outubro de 1999.

**Assessment of a Treponemal Competitive Enzyme
Immunoassay for Syphilis Antibody Screening in
23,531 Serum Samples from a Low Prevalence
Population.**

Dedico este trabalho para
Edson, Rafaella e Paula

Agradecimentos

A muitos tenho que agradecer porque ajudaram de forma decisiva para a concretização deste trabalho. A todos, antes de tudo, agradeço pela amizade.

À professora **Yoshimi Imoto Yamamoto** pela orientação e pelo apoio dispensado durante a execução dos trabalhos.

Ao professor **Luiz Fernando de Góes Siquira**, co-orientador desta dissertação, que sempre encontrou um tempo para conversar sobre o trabalho, mesmo nos períodos em que sua agenda não permitia.

À **Coordenação Nacional de DST e Aids** e ao seu Coordenador Dr. **Pedro Chequer**, que autorizou o uso das amostras do Primeiro Corte do Estudo com a População de Conscritos do Exército Brasileiro, coletadas em 19996.

Ao professor **Luiz Alberto Peregrino Ferreira**, responsável pelo tema desta dissertação, e que negociou junto à empresa Organon os *kits* imunoenzimáticos, possibilitou que toda a sorologia fosse feita no Serviço de Análises Clínicas do HU – UFSC e que sempre teve paciência de ler e sugerir modificações no texto.

À Dra. **Miriam Franchini** que também participou das negociações para a obtenção dos *kits* e que junto com o querido **John Penny** colaborou no abstract.

Aos professores **Maurício Alchorne** e **Sumie H. Shimizu**, membros da banca, pela avaliação crítica e pelas sugestões apresentadas.

À professora **Regina Ary Flório da Cunha** que durante a prova de qualificação apresentou importante contribuição ao trabalho.

Ao Dr. **Luiz Jorge Fagundes**, pelo interesse, análise criteriosa e correções realizadas ao texto.

À **Empresa Organon** por ter doado 25.000 testes do *kit* Trepanostika™, e à Dra. **Cíntia Vilhena dos Santos** pela presteza com que instalou os equipamentos para realização dos testes e por ter vindo pessoalmente a Florianópolis implantar a metodologia.

À **Empresa Biolab**, especialmente à Dra. **Zilá Rosa Belém** pela doação dos treponemas para a realização do *Western blot*.

Ao **Labortório Noel Nutels** e ao seu Diretor Dr. **Oscar Berro** pela doação dos reagentes para o FTA-ABS.

À **Fundação Osvaldo Cruz – BioManguinhos**, especialmente ao Dr. **Antônio Gomes P. Ferreira** por ter cedido as lâminas demarcadas utilizadas para fixar o antígeno para FTA-ABS.

Ao **Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário** da Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente aos **Bioquímicos e Técnicos do Setor de Imunologia Clínica** que dividiram comigo, com muito boa vontade, o espaço físico já tão pequeno para sua rotina.

Ao Bioquímico **Marcellus Reis** que programou o banco de dados utilizado para a análise dos resultados dos testes.

Aos Bioquímicos **Miguel Strazzer Neto** e **Thais Pizzolatti** sempre dispostos a ajudar.

Aos estagiários **Rodrigo Michels da Rocha**, **Cristiana Ropelato** e **Melissa N. Luciano**, pela colaboração na realização dos testes.

Aos **Professores, Técnicos e Pós-Graduandos** do Laboratório de Imunologia Clínica, do bloco 17, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração.

À querida **D. Arinda Sobral Góes Siqueira** que me acolheu, como filha, na sua casa em São Paulo, garantindo durante todos o mestrado um convívio muito agradável.

À amiga **Neuman C. Dantas** que, mesmo sobrecarregada em seu estágio na Oftalmologia do Hospital das Clínicas, sempre teve tempo e boa vontade para encontrar artigos nas diversas bibliotecas de São Paulo e mandar fotografar os *slides* da qualificação e da defesa.

À **Andréa Pruner Oliveira** por ter digitado as correções propostas na qualificação.

Ao Eng. **Amir Antônio Martins de Oliveira** que não se furtou em dar sua colaboração no texto, mesmo não se tratando de elementos porosos.

À pedagoga **Maria Lúcia Ribinick**, por ter feito as correções de português e apresentado sugestões de mudança na estrutura do texto.

Às amigas **Maria Cláudia S. Silva** e **Maria de Lourdes Rovaris** pelo estímulo dado durante o trabalho.

À Bibliotecária **Adriana de Almeida Barreiros**, pela boa vontade e eficiência na revisão das referências bibliográficas.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização deste trabalho.

ÍNDICE

Legendas.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. História da sífilis na civilização humana.....	2
1.2. Características da sífilis.....	4
1.3. Epidemiologia.....	7
1.4 O agente etiológico.....	10
1.4 Resposta imune à infecção por <i>Treponema pallidum</i>	14
1.6. Imunidade à infecção por <i>Treponema pallidum</i>	15
1.7 Metodologias diagnósticas em sua série histórica.....	15
1.8. Respostas sorológicas.....	23
OBJETIVOS.....	30
2. Objetivos.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3. Material e Método.....	33
3.1. Casuística.....	33
Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte.....	34
3.2. Material.....	35
3.3. Métodos.....	37
RESULTADOS.....	50
4. Resultados.....	51
DISCUSSÃO.....	62
5. Discussão.....	63
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
6. CONCLUSÕES.....	79
7. PERSPECTIVAS.....	80
RESUMO.....	81
8. Resumo.....	82
ABSTRACT.....	83
9. Abstract.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9. Referências Bibliográficas.....	86

Legendas

AEQ	Avaliação externa da qualidade
Aids	“Acquired immunodeficiency syndrome” (síndrome da imunodeficiência adquirida)
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CNDST e Aids	Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids.
BBI	Boston Biochemical Inc.
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etileno diamil tera-acético
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FTA-ABS	“Fluorescent Treponemal Antibody Absorption”
HIV	“Human immunodeficiency virus” (vírus da imunodeficiência adquirida)
IC	Intervalo de Confiança
IgG	Imunoglobulina de cadeia pesada γ
IgM	Imunoglobulina de cadeia pesada μ
kD	kilo Dalton
LR	Limite de reatividade (CO – “cutoff”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	“Open Read Frame” (fase de leitura aberta)
PCR	“Polymerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)
RHT	Reação de hipersensibilidade tardia
RIT	“Rabbit infectivity testes” (teste de infecciosidade em coelhos)
RPR	“Rapid Plasm Reagin”
TPHA	“ <i>Treponema pallidum</i> hemmagglutination assay” (reação de hemaglutinação para <i>Treponema pallidum</i>)
VDRL	“Venereal Disease Research Laboratory”

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A sífilis é uma doença infecciosa sistêmica crônica, causada pelo espiroqueta *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, caracterizada por períodos sintomáticos alternados por longos períodos de latência (KIRALY, 1973; LARSEN, 1995). *Treponema pallidum* dissemina-se por todo o organismo podendo causar doença nos mais variados órgãos. Ao longo de sua evolução e se não tratada, a sífilis pode apresentar manifestações cutâneas, cardíacas, ósseas e neurológicas, entre outras, como resultado das interações entre o agente e o hospedeiro, da resposta imune do hospedeiro e das reações inflamatórias resultantes da agressão ao tecido invadido (KIRALY, 1973).

Dentre as formas de transmissão, a sexual é a mais comum seguida pela transplacentária ou vertical e mais raramente pela sangüínea (VAN DER SLUIS, 1984; BAUGHN, 1989; LARSEN, 1990; KIRCHNER, 1991; NAUD, 1993).

1.1. História da sífilis na civilização humana

Controversa no aspecto relativo à sua origem, a sífilis tem sido objeto de estudo durante séculos. Após seu aparecimento em 1493 em Barcelona, essa doença disseminou-se em poucos anos por toda a Europa e apesar de ter feito menos vítimas do que a peste e a varíola, ainda não foi extinta. Foi descrita em

1530 pelo patologista italiano Hieronymus Fracastorius (SCHREIBER, 1991; SINGH,1999).

Na tentativa de compreender, interromper e curar a sífilis, a partir da primeira epidemia verificada no final do século XV, muitos cientistas direcionaram seus estudos para esse tema. Assim, em 1497 o médico Johannes Widmann reconheceu que a união sexual era o meio de transmissão da doença, enquanto era considerada pelo povo como um castigo divino por uma vida pecaminosa (SCHREIBER, 1991). Nesse período, muitas tentativas de cura foram feitas com o uso de mercúrio, arsênico ou guaiaco empregados na forma de infusões ou unguentos associados a suadouros ou quarentenas (SCHREIBER, 1991).

Convencido de que os métodos de cura eram inadequados, em 1891, o professor Boeck inicia o estudo de 1978 pacientes com sífilis primária e secundária, para analisar o comportamento da sífilis não tratada, conduzindo este estudo até 1910. Em 1929 Bruusgaard dá continuidade à proposta inicial do estudo, seguindo 473 pacientes. Os resultados destes estudos, conhecidos como “Estudo de Oslo“, permitiram estabelecer o curso natural da sífilis (CLARCK, 1964).

Em 1903 Metchnikoff e Roux conseguiram reproduzir a transmissão da sífilis para chimpanzés porém, apenas em 1905 o agente causador foi identificado por Schaudim e Hoffmann (BELDA, 1980).

O emprego de testes sorológicos para o diagnóstico da sífilis se inicia em 1906 quando Wassermann, Neisser e Brueck desenvolvem uma reação baseada no princípio de fixação do complemento, prova capaz de detectar reaginas no soro de pacientes com sífilis (PASSOS, 1995).

Em 1909 Paul Erlich e Sahachiro Hata utilizaram um composto arsenical, denominado salvarsan, que agia diretamente sobre *T. pallidum*, constituindo-se na primeira medicação ativa para o tratamento da sífilis (SCHREIBER, 1991). Nesse mesmo ano A. Coles descreve o método de pesquisa de *Treponema pallidum* em campo escuro (LARSEN, 1998). No ano seguinte, Jacobsthal propõe a primeira reação de floculação para diagnóstico sorológico da doença (BELDA, 1988; SCHREIBER, 1991; PASSOS, 1995).

Na publicação de 11 de janeiro de 1913 do “Journal of American Medical Association”, Nichols e Hough relatam um caso de neurosífilis e demonstram a presença de *Treponema pallidum* no líquido. Para isso utilizaram a técnica de inoculação do líquido cefalorraquidiano do paciente em testículos de coelho, sendo essa a primeira vez que coelhos foram utilizados para crescimento e isolamento de treponemas. Após o isolamento, a cepa continuou sendo mantida através de passagens em coelhos sendo conhecida como *Treponema pallidum* cepa Nichols (NICHOLS, 1913).

Uma nova era na sífilis teve início em 1943, quando Mahoney, Arnold e Haria utilizaram com sucesso penicilina no seu tratamento (SCHREIBER, 1991).

Acreditava-se na época que os problemas da sífilis estavam solucionados, porque essa doença que foi motivo de preocupações das autoridades científicas e sanitárias, passava a ter tratamento simples e eficiente. No entanto, a euforia inicial não refletiu a realidade, e a doença vem se manifestando em diversos locais do planeta em focos endêmicos e eventualmente epidêmicos, resultando ainda em nascimento de crianças portadoras de sífilis congênita (BAUGHN, 1989; PASSOS, 1995; CDC, 1998b).

O estudo de *Treponema pallidum* permanece objeto da ciência até hoje, porque ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos de infecciosidade e principalmente de escape imunológico utilizados por esta bactéria (HOLT, 1978; NORRIS, 1982; FRASER, 1998; RADOLF, 1999).

1.2. Características da sífilis

A transmissão sexual da sífilis requer contato direto com lesões infectantes. Aproximadamente 30% das pessoas que mantém relações sexuais com um parceiro infectado desenvolverão sífilis (LARSEN, 1995).

Após o contato inicial, o treponema coloniza o local de entrada, geralmente na mucosa intacta ou em pequenas lesões de pele, e dissemina-se através do corpo, pelas vias linfáticas e ou sanguíneas (LARSEN, 1995; VAN DER SLUIS, 1987;

AZULAY, 1998). Apesar do mecanismo exato de penetração de *Treponema pallidum* em células não ser totalmente conhecido, foi observado que ocorre ligação da bactéria às células de mamíferos através de receptores presentes na membrana celular. A invasão celular é um fator crítico na virulência de *T. pallidum*, conforme demonstrado por sua habilidade de penetrar monocamadas de células endoteliais e membranas intactas (SINGH, 1999).

Após a infecção inicia-se a chamada sífilis primária que caracteristicamente, após um período de incubação de 10 a 90 dias, manifesta-se com o aparecimento, no local de entrada da bactéria, de uma lesão indolor de base endurecida, contendo grande número de treponemas, denominada cancro duro ou protossifiloma. Os gânglios regionais apresentam-se aumentados e indolores. O cancro duro pode desaparecer espontaneamente num período de uma a cinco semanas, sem deixar cicatriz (BELDA, 1988; KIRCHNER, 1991; NAUD, 1993).

Se não tratada, a doença evolui para sífilis secundária, período em que o treponema já invadiu todos os órgãos e líquidos do corpo. A principal manifestação clínica do secundarismo é o exantema cutâneo, rico em treponemas, que se apresenta na forma de máculas, pápulas ou de grandes placas eritematosas branco-acinzentadas em regiões úmidas do corpo, denominadas condiloma lata. A partir da infecção, os sintomas da sífilis secundária podem se manifestar entre 6 semanas e 6 meses (KIRCHNER, 1991).

Após o desaparecimento do exantema, a doença entra no período latente, considerado recente no primeiro ano de infecção e tardio após esse período. A sífilis latente não apresenta qualquer manifestação clínica. Na doença clássica, entre 10 e 20 anos após o contágio inicial, cerca de um terço dos pacientes com sífilis latente desenvolvem sífilis terciária que se caracteriza por manifestações tegumentares, cardiovasculares ou neurológicas, entre outras. O quadro clássico não é observado nos indivíduos coinfectedados com o vírus da imunodeficiência humana – HIV, que apresentam rápida evolução da forma aguda à terciária. (NAUD, 1993; LARSEN, 1995).

Atualmente observa-se a freqüência cada vez maior de formas latentes ou de casos de curso clínico modificado devido ao abuso de antibióticos em doses insuficientes (PASSOS, 1995; PODWINSKA, 1996; AZULAY, 1998).

Com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), formas clínicas atípicas com evolução aguda e grave, como a sífilis maligna precoce, têm sido observadas (PODWINSKA, 1996; AZULAY, 1998).

Úlceras sifilíticas atuam como porta de entrada para o HIV. A análise de casos de infecção simultânea por HIV e *T. pallidum* indica alterações tanto na resposta imune humoral do hospedeiro quanto na resposta à terapia para sífilis, além da evolução mais rápida para Aids (HICKS, 1987; JOHNS, 1987; HASS, 1990; PODWINSKA, 1996). A associação de *T. pallidum* e HIV tem sido responsabilizada também por alterações no diagnóstico sorológico da sífilis, como o aumento da ocorrência do fenômeno de prozona nos testes não treponêmicos, decorrentes do excesso de anticorpos, devido a proliferação policlonal de linfócitos B produtores de anticorpos que pode ocorrer em alguns casos (HASLETT, 1994).

Em outros, verifica-se ausência persistente de anticorpos na vigência de doença ativa, que só aparecem algumas vezes muito tempo após o tratamento, tornando difícil seu acompanhamento. O mecanismo de instalação e a resposta imune à infecção nesses indivíduos não estão totalmente compreendidos (HICKS, 1987; HASS, 1990; LARSEN, 1990; MARRA, 1992; AZULAY, 1998).

1.2.1. Sífilis congênita

A sífilis congênita é mais severa quanto mais recente for a infecção materna. A taxa de transmissão vertical em mulheres não tratadas é de 70% a 100% na sífilis primária, 40% na sífilis latente recente e de 10% na sífilis latente tardia (SINGH, 1999).

Harter e Benirschke (1975), demonstraram a presença de *T. pallidum* tanto em placenta quanto em fetos de 9 a 10 semanas de gestação, contradizendo a

teoria anteriormente proposta de que as células de Langhans atuam até o quinto mês de gestação, como barreira protetora contra a infecção fetal por *T.pallidum*.

Ainda segundo Harter e Benirschke (1975), o fato de não existir nas biópsias dos fetos de 9 a 10 semanas, sinais de resposta inflamatória ou lesão tecidual no local onde foram encontrados os treponemas, justifica o fato de que as manifestações clínicas só apareçam no terceiro trimestre, na forma de abortamento, nascimentos prematuros ou nascimentos seguidos de morte.

Quando não se manifesta com essas características, a infecção congênita pode permanecer latente, vindo a se expressar durante a infância ou mesmo na vida adulta. As manifestações perinatais ocorrem principalmente na forma de lesões bolhosas, ricas em treponemas, na palma das mãos, planta dos pés, ao redor da boca e do anus. Os sintomas da sífilis congênita tardia incluem tibia em sabre, ceratite intersticial, dentes de Hutchinson, surdez e comprometimento de fígado e pulmão (BAUGHN, 1989; LARSEN, 1990; BROMBERG, 1993; GENEST, 1996).

1.3. Epidemiologia

A sífilis é uma doença cosmopolita, mais prevalente em zonas urbanas, não podendo ser relacionada a nenhum grupo racial e sua incidência atual parece refletir mais fatores sociais como pobreza e baixa escolaridade do que fatores biológicos (BENENSON, 1997; CDC, 1992, 1998, 1998a).

Ao longo da história, a doença teve seu primeiro surto epidêmico no final do século XV, constituindo-se em um importante problema de Saúde Pública mundial durante a chamada “idade da exploração” caracterizada pelas grandes navegações. No século XIX era “onipresente” sendo considerada como a “Síndrome da Imunodeficiência Adquirida” daquela época (FRASER, 1998).

Entre as décadas de 1960 e 1980, o número total de casos notificados em muitos países europeus declinou. Em 1980, no Reino Unido foram notificados 2700 casos, predominantemente em pessoas do sexo masculino, sugerindo maior reservatório da infecção na população homossexual masculina. A tendência de

queda foi mantida e, em 1990, os 373 casos notificados representavam uma incidência menor do que 1 caso para cada 100.000 pessoas (TANG, 1991; KINGHORN, 1993).

Nos Estados Unidos, ao contrário, verificou-se lento aumento na incidência a partir do anos 70, após o período de revolução sexual na metade da década de 60, até 1982, seguido de queda até 1986 com a descoberta da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Em 1987, 35.241 casos de sífilis primária e secundária foram relatados ao CDC, significando um aumento de 30% no número de casos em relação ao ano anterior. Em 1990 os 50.233 casos notificados correspondiam a 20 casos para cada 100.000 pessoas (KIRCHNER, 1991).

A incidência de sífilis nos Estados Unidos é distribuída muito heterogeneamente. Os estados do sul apresentam número de casos desproporcionalmente elevado em relação ao resto do país (ROLFS, 1990; MARUTI, 1997; CDC, 1998a). Essa distribuição parece estar relacionada a classes econômicas menos favorecidas, com fortes indícios de um processo de "importação" da doença, por sua proximidade com as fronteiras americanas e a descontrolada entrada de imigrantes ilegais vindos do México e das Américas Central e do Sul. Mesmo não vinculada a raças, verifica-se que os hispânicos brancos são o segundo grupo com maior prevalência da doença, que só é menor do que a prevalência verificada entre os negros americanos do sul e de baixa renda (CDC, 1998a). Nessa população são atingidos em especial os adolescentes, e entre os fatores de risco observa-se o consumo de drogas, a prostituição, a Aids e o início precoce da vida sexual (BENENSON, 1997).

Estudos realizados em países africanos mostram alta prevalência, como os 8% verificados em uma comunidade semi-rural do Gabon. Nessa comunidade foram encontrados 99 soros reagentes para testes treponêmicos, em 1251 soros analisados (SCHRIJVERS, 1989). Em Zimbábue, um inquérito sorológico em gestantes mostrou prevalência de 13,75% (RUTGERS, 1993).

Hiltunen-Back (1996) relata que na Finlândia até o início dos anos 90, o número de casos anuais de sífilis era de 30 a 40 e que desde 1993 a incidência vem aumentando, tendo ocorrido 118 casos em 1995. Esse aumento é observado

principalmente nas regiões que fazem fronteira com a Rússia. Desde o colapso da União Soviética a incidência de sífilis aumentou muito na Rússia, com 255.000 casos relatados em 1995, ano em que a cidade de São Petersburgo atingiu a taxa de 318 casos para cada 100.000 pessoas.

No Brasil, devido principalmente a subnotificação, temos poucas informações a respeito do comportamento da doença (PASSOS, 1995).

Os dados epidemiológicos disponíveis são relativos a casos notificados de sífilis congênita. No período compreendido entre 1995 e 1997 foram notificados em todo o país 2344 casos. Destes, cerca de 61% são correspondentes à região sudeste, 17% à região nordeste, 3% à região norte, 17% à região centro-oeste e 2% à região sul. (CNDST e Aids, 1997). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), esses dados correspondem a 1/3 do total esperado para um país dito “em desenvolvimento”. Os dados de 1997 mostraram aumento no número de notificações nas regiões norte e nordeste em relação a 1995 e 1996, respectivamente 8% e 37% do total de casos. Por outro lado a região sudeste contribuiu com 37%, estranhamente nenhum caso foi notificado no Estado de São Paulo (CNDST e Aids, 1997), contradizendo a estimativa da Secretaria Estadual da Saúde daquele estado que esperava para 1996 um registro de aproximadamente 20.000 casos, chamando a atenção inclusive para a necessidade de melhorar o diagnóstico e tratamento em gestantes (PROMED, EDR, 1996).

A sífilis é, entre as patologias atualmente endêmicas, motivo de preocupação das autoridades sanitárias devido, principalmente, ao número crescente de casos na sua forma congênita e latente (CNDST e Aids, 1998).

Esta doença considerada, ainda hoje, um importante problema de saúde pública mundial, vem exigindo da comunidade científica métodos diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos de forma a favorecer a rápida intervenção no elo da cadeia epidemiológica nos crescentes programas de combate e controle desta morbidade na população geral (COHEN, 1992).

1.4 O agente etiológico

O termo espiroqueta é utilizado para agrupar organismos flexíveis, finos, de formato espiral, que diferem morfológicamente de outros procariontes pela presença de uma fibra axial, também conhecida como endoflagelo ou filamento axial, responsável pelos movimentos de rotação e flexão destas bactérias (KIRALY, 1973; FRASER, 1998).

Membros deste grupo invariavelmente possuem: membrana externa, que envolve toda a célula e cilindro protoplasmático constituído de parede celular, membrana celular, citoplasma e filamento axial (KIRALY, 1973; FRASER, 1998). A ordem *Spirochaetales* agrupa 5 gêneros: *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Borrelia*, *Leptospira* e *Treponema*. Esta divisão é baseada em características fisiológicas e morfológicas (HOLT, 1978).

Nas diversas cepas de treponemas, quatro patogênicas e pelo menos seis não patogênicas, seu tamanho varia de 0,09 a 0,5 μm por 5 a 20 μm . O comprimento de cada espira é variável, as extremidades do corpo são arredondadas ou afiladas e possuem caracteristicamente de três a cinco fibras axiais (HOLT, 1978). *Treponema pallidum* tem de 6 a 20 espiras, medindo entre 6 a 20 μm de comprimento por 0,1 a 0,18 μm de largura, dividindo-se transversalmente a cada 30 horas (VAN DER SLUIS, 1987; AZULAY, 1998; SINGH, 1999).

O seqüenciamento do genoma de *Treponema pallidum* demonstrou que a bactéria tem um dos menores genomas de procariontes. Seu cromossoma é circular, com aproximadamente 1.138.000 pares de bases (bp), contendo 1.041 ORF (fases de leitura abertas) (FRASER, 1998; SINGH, 1999). Estima-se que 55% dessas ORF sejam responsáveis pelas funções biológicas da bactéria, 17% codificam proteínas que cruzam com outras espécies e 28% representam novos genes (SINGH, 1999). RADOLF e colab. (1999), consideram que as dúvidas relacionadas a fatores fisiológicos e de virulência da bactéria só serão esclarecidas quando as informações contidas nos genes funcionais forem compreendidas.

Os treponemas podem ser divididos em cepas de vida livre, saprofitas ou não patogênicas, e cepas patogênicas responsáveis pela pinta, boubas, sífilis endêmica e sífilis venérea. As três primeiras são doenças restritas a certas regiões enquanto a sífilis venérea é cosmopolita de distribuição mundial. Até agora, não há técnicas sorológicas e morfológicas que permitam a distinção entre *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (sífilis venérea), *Treponema pallidum* subespécie *endemicum* (sífilis não venérea), *Treponema pallidum* subespécie *pertenue* (boubas) e *Treponema carateum* (pinta). Nenhum método diagnóstico é subespécie específico. A diferenciação deve ser feita considerando-se dados clínicos e epidemiológicos (LARSEN, 1990; BENENSON, 1997). Métodos genéticos apontam a capacidade de distinção entre *Treponema pallidum* subespécie *endemicum*, *Treponema pallidum* subespécie *pertenue* e *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* através do estudo do gene *tpp15* que codifica a lipoproteína de 15 kD (SINGH, 1999).

1.4.1. Características antigênicas de *Treponema pallidum*

As características antigênicas de *Treponema pallidum* ainda não são totalmente conhecidas, sendo que um dos grandes obstáculos para ampliar esse conhecimento deve-se a pequena disponibilidade de bactérias para estudo pois, seu crescimento só é possível “in vivo”, por inoculação de treponemas móveis e virulentos em bolsa escrotal de coelhos. O uso dessa técnica de cultivo além de produzir limitado número de bactérias, também apresenta grande possibilidade de contaminação desses microrganismos com componentes dos tecidos do testículo de coelhos (BLANCO, 1994; LARSEN, 1998; RADOLF, 1999). O cultivo “in vitro” de treponemas viáveis e virulentos é muito difícil.

Fieldsteel e colab. (1981), obtiveram sucesso no cultivo “in vitro” de *T. pallidum*, utilizando cultura em monocamada de linhagem de células de crescimento lento de mamíferos, células epiteliais Sf1Ep de coelhos mantidas em meio essencial de Eagle modificado com 20% de soro fetal bovino, ditiotreitól

(DTT) e extrato de testículos de coelhos infectados com *T. pallidum*, incubados a 33°C sob atmosfera contendo 1,5% de oxigênio.

Norris (1982) ao reproduzir essa técnica de cultivo introduziu algumas modificações e determinou que entre todos os componentes do meio, o soro fetal bovino é, provavelmente, o elemento mais crítico, e sua toxicidade pode ser responsável pela perda da viabilidade da cultura. Nesse experimento, Norris obteve crescimento até 26 vezes maior do que o obtido por Fieldsteel.

O sucesso desses experimentos, no entanto, não foi suficiente para atingir o objetivo de cultivar continuamente treponemas virulentos “in vitro”. Além disso, as exigências desse cultivo restringem seu uso a laboratórios de pesquisa muito especializados (FITZGERALD, 1977; FIELDSTEEL, 1982; FLICHMAN, 1995).

O genoma de *Treponema pallidum* mostrou que a bactéria contém ORF codificando hemolisinas e citoxinas com importância patogênica ainda não relacionada a fatores de virulência conhecidos (RADOLF, 1999). Após o seqüenciamento completo do seu genoma, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos patológicos e metabólicos, permanecendo o conceito de que é uma bactéria não cultivável e parasita humana obrigatória (FRASER, 1998).

O grupo de pesquisa em Polipeptídeos de *T. pallidum*, liderado por Steve Norris, identificou até 1993, 84 proteínas imunogênicas, das quais são consideradas mais importantes a TpN60, provavelmente uma “heat shock proteina”; as lipoproteínas de membrana TpN47, TpN 44,5, TpN36, TpN34, TpN17 e TpN 15; a TpN 37, uma proteína de endoflagelo; a TpN24, uma proteína secretora e a TpN 19, provavelmente citoplasmática (SELL, 1993).

Blanco e colab. (1995), isolaram o gene Tromp1 que codifica a proteína de 31 kD, considerada uma proteína transmembrana.

Confirmando a importância imunogênica dessas proteínas vários estudos têm sido conduzidos para determinar as suas funções, localizações ou seqüenciar os genes que as codificam (CHAMBERLAIN, 1989; ISAAC, 1989; RADOLF, 1998).

As dificuldades de obtenção de antígenos treponêmicos em quantidade suficiente para estudo ou desenvolvimento de reagentes têm sido solucionadas

com o uso de antígenos recombinantes ou de peptídeos sintéticos (IJSELMUIDEN, 1989; SATO, 1995).

1.4.2. Membrana externa de *Treponema pallidum*

A identificação e localização das proteínas de membrana desta fastidiosa espiroqueta tornou-se o principal objetivo da pesquisa em treponemas, porque representam potenciais vacinógenos, alvos da resposta imune e ou fatores de virulência (CHAMBERLAIN, 1989; COX, 1992; SELL, 1993; BLANCO, 1995).

A presença de uma membrana externa em *T. pallidum*, revestindo o espaço periplásmico e de uma membrana citoplasmática, torna essa bactéria de alguma maneira análoga a enterobactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*.

Entretanto, sabe-se agora, que existem diferenças substanciais entre a membrana externa de *T. pallidum* e a das bactérias da família *Enterobacteriaceae*. A membrana externa de *T. pallidum* tem menos lipopolissacarídeos, é mais frágil e tem uma baixa relação proteína/lipídeo (BLANCO, 1994; RADOLF, 1995).

Essa pequena quantidade de proteínas em relação aos lipídeos pode ser responsável pela baixa reatividade de treponemas virulentos durante a incubação “in vitro” com soro reagente para sífilis. Cox e colab. (1992), demonstraram por técnicas de microscopia imunoeletrônica e de radioimunoensaio, que os principais imunógenos do *T. pallidum* não estão expostos na superfície da bactéria. Além disso, outros estudos com microscopia eletrônica revelaram que a quantidade de proteínas na membrana externa de treponemas virulentos é cerca de 2 vezes menor à encontrada nas bactérias gram-negativas, característica que pode ser fator chave na patogenicidade desses treponemas, na diminuição da resposta imune e no estabelecimento de infecção crônica. E justifica, pelo menos em parte, a habilidade desta espiroqueta de provocar resposta imune diminuída durante a invasão ao hospedeiro (BLANCO, 1994).

O material amorfo encontrado ao redor dos treponemas patogênicos, obtidos de orquites recentes de coelhos, do cancro duro e das lesões da sífilis secundária, pode ser mucopolissacárides ácidos compostos de ácido hialurônico e

sulfato de condroitina. Esse material parece proteger os treponemas contra a resposta de anticorpos e parece inibir a fagocitose de uma maneira análoga ao papel da cápsula hialurônica nos estreptococos (KIRALY, 1973; FITZGERALD, 1981).

A perda parcial da membrana externa, cerca de 3 horas após administração de penicilina, sugere que essa também é constituída de ácido murâmico (KIRALY, 1973).

1.4 Resposta imune à infecção por *Treponema pallidum*

Após a infecção, a resposta imune se desenvolve com a participação de eventos tanto celulares quanto humorais (FIUMARA, 1980; BLANCO, 1994).

Esta resposta é bastante complexa na sífilis, a resposta no local da infecção é mais rápida do que a resposta sistêmica por isso, a cicatrização das lesões pode ocorrer antes do desenvolvimento da imunidade sistêmica. A precisa contribuição da resposta humoral versus resposta celular não está bem definida (FITZGERALD, 1981).

Na sífilis recente experimental a resposta celular é constituída inicialmente por células mononucleares, principalmente linfócitos. Os macrófagos estão presentes em grande quantidade e os linfócitos B se apresentam em pequeno número durante o desenvolvimento da lesão primária. Nessa fase, também ocorre a participação de células plasmáticas (LUKEHART, 1980). Segundo Fitzgerald (1981), com exceção das lesões gomosas presentes na sífilis terciária, a infiltração de linfócitos e células plasmáticas é característica das lesões por treponemas em todos os estágios da doença.

Pacientes com sífilis secundária, no período de latência ou com sífilis terciária, apresentam reação de hipersensibilidade tardia (RHT) quando desafiados com antígenos de *T. pallidum* (FITZGERALD, 1981). Existem evidências de que a hipersensibilidade tardia é o principal mecanismo utilizado para destruição dos treponemas. Na sífilis experimental, em coelhos, as lesões

primárias são características de RHT, com destruição de um grande número de *T. pallidum*, que são removidos por fagocitose e digestão (SELL, 1993).

A resposta imune humoral é mediada por um grande número de anticorpos que se formam durante o curso da doença, incluindo reaginas, anticorpos imobilizadores de *Treponema pallidum*, aglutininas, hemaglutininas e outros anticorpos treponêmicos. Todos esses anticorpos são importantes no diagnóstico sorológico, porém não exercem função imune protetora (FITZGERALD, 1981).

1.6. Imunidade à infecção por *Treponema pallidum*

Uma infecção por *Treponema pallidum* não confere imunidade protetora à reinfecção, como a verificada no sarampo por exemplo (FIUMARA 1980). A duração da imunidade, subsequente à sífilis, está relacionada ao tempo de duração da doença antes do tratamento. Essa imunidade, no entanto, não é permanente. Com o decorrer do tempo, o paciente mesmo não tratado torna-se gradativamente susceptível à reinfecção, a despeito da permanência da resposta imune humoral (FIUMARA, 1980; TABOR, 1984; AKINS, 1993; MEYER, 1996).

Foi observado que na reinfecção os títulos de anticorpos são mais altos e sua diminuição, em resposta ao tratamento, mais lenta (FIUMARA, 1980).

1.7 Metodologias diagnósticas em sua série histórica

O diagnóstico laboratorial da sífilis é baseado na pesquisa direta do agente, no diagnóstico sorológico e mais recentemente nas técnicas que pesquisam a presença de ácidos nucléicos de *Treponema pallidum*.

1.7.1. Pesquisa direta de *Treponema pallidum*

A detecção direta do agente pode ser feita por três métodos. O primeiro conhecido como inoculação animal ou teste de infecciosidade em coelhos (RIT – Rabbit Infectivity Tests), é realizado em coelhos por inoculação intradérmica ou intratesticular de material supostamente infectado com *T. pallidum*. Entre 7 a 14 dias após a inoculação espera-se que o animal desenvolva uma orquite, caso isso não aconteça, coleta-se sangue periodicamente, para execução de testes sorológicos. Esta técnica apesar de muito sensível, com habilidade teórica de identificar um único organismo viável e de ter sido utilizada para isolamento da cepa Nichols, tem atualmente, uso restrito. Principalmente, porque neste teste, o resultado só é considerado negativo se as sorologias realizadas com o soro do animal se mantiverem negativas até 90 dias após a inoculação; período este muito longo para as necessidades atuais de intervenções clínicas e terapêuticas (NICHOLS, 1913; LARSEN, 1990; SINGH, 1999).

A segunda técnica de detecção direta desta bactéria é denominada pesquisa de treponema em campo escuro. Constitui-se na pesquisa do agente por microscopia óptica com um condensador de campo escuro, que permite visualizar treponemas móveis no exsudato obtido do cancro duro, ou de lesões do período secundário (LARSEN, 1990; BELDA, 1993; FLICHMAN, 1995; LARSEN, 1998). Esta é a técnica de escolha para o diagnóstico da sífilis quando existe lesão, por ser de baixo custo, permitir a identificação da doença na sua fase precoce, e por apresentar a possibilidade de se diferenciar treponemas saprofíticos de *T. pallidum* (BENENSON, 1997).

Alternativamente, pode-se pesquisar o agente da sífilis em exsudato de cancro duro ou mesmo em outras lesões exsudativas infectadas, por técnica de imunofluorescência direta. Essa metodologia utiliza anticorpos monoclonais anti-*Treponema pallidum* marcados com substância fluorescente, permitindo a visualização da bactéria em microscópio de fluorescência. Apesar de muito sensível, essa pesquisa tem sua especificidade dependente da qualidade do anticorpo monoclonal e seu uso é limitado pelo alto custo operacional (LARSEN,

1990, 1998).

A presença de *Treponema pallidum* pode também ser pesquisada em peças histológicas, com a utilização de técnicas especiais de coloração como a de Warthin-Starry (LILLIE, 1976). Biópsias coradas pela prata podem ajudar a esclarecer casos de sorologia negativa com suspeitas clínicas de sífilis em pacientes coinfectados por HIV (HICKS, 1987).

1.7.2. Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico da sífilis é baseado na pesquisa de reagentes ou anticorpos anticardiolipínicos denominados anticorpos não treponêmicos e na pesquisa de anticorpos treponêmicos (BELDA, 1980; EGGLESTONE, 1996; LARSEN, 1998).

A avaliação e a padronização dos testes sorológicos para sífilis tem sido a maior preocupação nesta sorologia, desde o desenvolvimento do primeiro teste. Na avaliação e padronização dos testes, as principais características consideradas são a sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade do antígeno empregado (LARSEN, 1990).

Da mesma forma que a verificada para a maioria das doenças, ainda não existe para o diagnóstico sorológico da sífilis um teste ideal, com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, que possa ser utilizado em qualquer fase da doença com garantia de que sejam detectados anticorpos mesmo em diminuta quantidade e que não reajam inespecificamente (MATHEUS, 1979; LARSEN, 1995).

Os testes para detecção de anticorpos não treponêmicos, representados pelo teste VDRL, apresentam sensibilidade variando entre 74% a 86% na sífilis primária, 100% na sífilis secundária, 88% a 100% na sífilis latente e de 37% a 94% na sífilis tardia. A especificidade do VDRL situa-se entre 96% a 99% (LARSEN, 1995).

Já os testes treponêmicos têm maior sensibilidade, sendo o FTA-ABS, reagente entre 70% e 100% dos casos de sífilis primária, em 100% dos casos de sífilis secundária e latente e em 96% dos casos de sífilis tardia. A especificidade deste teste varia entre 94% a 100%. O teste treponêmico de hemaglutinação para *T. pallidum*, é menos sensível do que o FTA-ABS na sífilis primária, sendo capaz de detectar no máximo 90% (69% a 90%) dos casos e na sífilis latente, período em que detecta de 97% a 100% dos casos (LARSEN, 1995).

1.7.2.1. Testes não treponêmicos

A primeira técnica utilizada para a detecção de anticorpos não treponêmicos foi a reação de fixação de complemento, utilizando como antígeno extrato de fígado de natimortos portadores de sífilis congênita. A técnica de fixação do complemento é muito trabalhosa, exige rigorosa padronização de reagentes, e necessita de 24 h para obtenção do resultado. Por isso, foi substituída pelas técnicas de Michaelis (1907), de Meinicke (1917) e posteriormente pela primeira técnica de floculação, descrita por Kahn em 1922 (FLICHMAN, 1995; LARSEN, 1998). A falta de padronização fez com que essas últimas também fossem substituídas. Atualmente o teste não treponêmico mais utilizado é o VDRL e suas variações, que seguem a padronização proposta por Pangborn em 1941 (LARSEN, 1990; FLICHMAN, 1995).

Os testes não treponêmicos baseiam-se na utilização de uma suspensão antigênica padrão, composta de cardioplipina, colesterol e lecitina, para pesquisa de anticorpos lipóidicos ou anticardioplipínicos, conhecidos como reaginas (NAUD, 1993; FLICHMAN, 1995). Esses anticorpos são do tipo IgM (19 S) ou IgG (7 S) e costumam ser produzidos em resposta a destruição tecidual aguda ou crônica e por esse motivo podem ser produzidos durante o curso de outras doenças que não necessariamente a sífilis (KIRALY, 1973; LARSEN, 1995; MEYER, 1996; EGGLESTONE, 1997; LARSEN, 1998).

Com o objetivo de explicar o comportamento dos testes não treponêmicos, Belise (1994), comparou a composição dos fosfolípedes das membranas de

Treponema pallidum e *B. burgdorferi*, concluindo que a presença de cardiolipina exclusivamente na membrana de *Treponema pallidum* pode explicar a presença desses anticorpos na infecção por esse treponema e não em infecções por outros espiroquetas. Da mesma maneira, esse achado pode justificar o encontro de altos títulos de anticorpos anticardiolipínicos na sífilis comparados aos baixos títulos encontrados em doenças com grande destruição tecidual como, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (BELISE, 1994).

Entre os vários testes não treponêmicos, os testes de microfloculação em lâmina VDRL – Venereal Disease Research Laboratory, desenvolvido em 1946 e o RPR – Rapid Plasm Reagin, desenvolvido em 1957, são os mais utilizados. O primeiro se aplica a amostras de soro e líquido enquanto o segundo a amostras de soro ou plasma, não devendo ser utilizado para líquido (FLICHMAN, 1995; LARSEN, 1995).

O teste RPR é uma modificação do teste VDRL que além de cardiolipina, colesterol e lecitina, contém cloreto de colina, EDTA (ácido etileno diamil tetra-acético) e carvão coloidal. O cloreto de colina é utilizado para dispensar a necessidade de inativação da amostra, o EDTA para aumentar a estabilidade da suspensão antigênica e o carvão coloidal para permitir a visualização da reação a olho nu (LARSEN, 1990; FLICHMAN, 1995; LARSEN, 1995).

Esses dois testes de floculação são normalmente empregados para triagem, determinação do título e acompanhamento do tratamento, principalmente porque a resposta à terapêutica reflete na queda dos níveis de anticorpos (NAUD, 1993; MEYER, 1996).

Como alternativa aos testes não treponêmicos de floculação foram desenvolvidos testes imunoenzimáticos utilizando-se antígeno cardiolipínico. O primeiro desses testes foi desenvolvido em 1987 por Pedersen e colab., seguido posteriormente pelo teste “Visuwell Reagin”, desenvolvido por White e colab. em 1989 que apresentou valores de sensibilidade e especificidade semelhantes aos do VDRL.

SATO (1994), padronizou e avaliou na triagem de sífilis um teste não treponêmico imunoenzimático denominado “VDRL-ELISA”. Em seu estudo

determinou que para a sensibilização da placa de poliestireno existe necessidade de alterar a relação cardiolípidina/colesterol/lecitina, do antígeno clássico de VDRL, aumentando a quantidade de cardiolípidina. Além disso, observou que a inativação da amostra influencia os resultados dos testes, tendendo a apresentar resultados falso-positivos. Seus resultados apresentaram sensibilidade de 92% e especificidade de 93% na população estudada.

A principal desvantagem dos testes não treponêmicos imunoenzimáticos é o fato de não permitirem determinação do título de anticorpos presentes no soro dos pacientes (LARSEN, 1995).

1.7.2.2. Testes treponêmicos

A quantidade e os tipos de antígenos reconhecidos pelos anticorpos antitreponêmicos variam durante o curso da doença. A síntese e a presença de anticorpos IgM específicos para *T. pallidum* dependem da atividade da doença e da presença do agente infeccioso enquanto que, os anticorpos IgG específicos persistem nos diferentes estágios da doença, e são detectados mesmo após o tratamento, podendo permanecer por toda a vida. A presença desses anticorpos após tratamento eficaz, é conhecida como cicatriz imunológica (PARIS-HAMELIN, 1978; FIUMARA, 1980).

Os testes treponêmicos são os primeiros a se positivar, e entre esses destaca-se o teste de imunofluorescência indireta (FTA-ABS – Fluorescent Treponemal Antibody Absorption), que detecta anticorpos precocemente, já entre o 8º e o 15º dia após a infecção (FLICHMAN, 1995).

A pesquisa de anticorpos antitreponêmicos na maioria dos laboratórios de sorologia é feita utilizando-se a reação de FTA-ABS que baseia-se na ligação de anticorpos presentes no soro de pacientes ao antígeno *T. pallidum*, fixado a uma lâmina de microscopia previamente demarcada. O soro deve ser inativado e adsorvido com extrato de cultura de treponemas não patogênicos (treponemas de Reiter) para remoção de anticorpos inespecíficos, ou seja, anticorpos de grupo. A reação é revelada com a adição de um conjugado composto de imunoglobulina

anti-humana (do tipo IgG ou IgM), marcada com isotiocianato de fluoresceína. A visualização da reação é feita em microscópio de fluorescência (KIRALY, 1973; LARSEN, 1990.).

Esse teste é considerado como referência na sorologia da sífilis (LARSEN, 1998), no entanto, a sua execução muito trabalhosa e sua difícil leitura dificultam o seu uso em rotinas muito grandes e que necessitam de agilidade na emissão dos resultados. Por isso o FTA-ABS vem sendo substituído por metodologias que permitem a automatização dos procedimentos técnicos e de leitura, tais como o método de hemaglutinação e principalmente o método imunoenzimático (KIRCHNER, 1991; EGGLESTONE, 1997).

A reação de hemaglutinação mais empregada atualmente é denominada microhemaglutinação, e é realizada em placas de poliestireno com 96 cavidades.

Nessa reação, o soro também adsorvido com um extrato de treponemas de Reiter, é colocado em contato com hemácias sensibilizadas com antígenos de *Treponema pallidum*. A aglutinação indireta das hemácias, resultante da presença de anticorpos, é visualizada a olho nu. É ainda discutível a utilização dessa metodologia, devido a restrição de uso na sífilis primária porque nessa fase da doença, segundo alguns autores, sua sensibilidade varia entre 69% e 90% (LARSEN, 1990; EGGLESTONE, 1997).

Nas reações imunoenzimáticas o soro é pipetado em placas de poliestireno de 96 cavidades, revestidas com o antígeno. A ligação antígeno-anticorpo é evidenciada pela adição de um conjugado enzimático seguido de seu substrato. A reação é lida em espectrofotômetro (DE MAJO, 1996; EBEL, 1998). Os testes imunoenzimáticos (IgG e IgM), com antígenos treponêmicos, têm segundo EGGLESTONE (1997), sensibilidade muito próxima ao do teste FTA-ABS, sendo de 90% na sífilis primária, 100% na secundária e de 95% a 100% na latente.

Os testes imunoenzimáticos do tipo ELISA, constituem hoje a metodologia de escolha para triagem de amostras na maioria dos laboratórios de sorologia, principalmente devido a sua padronização e objetividade. A sorologia para sífilis tem particularidades que tornam difícil a escolha do melhor teste, no entanto é crescente o número de publicações apresentando resultados de testes

padronizados ora utilizando *Treponema pallidum* como antígeno, ora algum peptídeo sintético ou proteína recombinada como por exemplo a proteína de membrana TmpA de 42 kD, purificada a partir de *E. coli* K12 (IJSELMUIDEN, 1989; LARSEN, 1995).

IJSELMUIDEN (1989) estudou 505 soros utilizando um teste imunoenzimático com antígeno TmpA, concluindo que este antígeno é eficiente na triagem de grande número de amostras, na detecção de sífilis e pinta ativas e no monitoramento da resposta do paciente ao tratamento. Porém, seus dados não são conclusivos quanto ao comportamento do antígeno na detecção de casos de sífilis latente.

Dos testes treponêmicos, a reação de *Western blot* é a menos utilizada em laboratórios de rotina devido ao alto custo e difícil aquisição comercial. É uma reação sensível e precoce, que apresenta as proteínas da bactéria separadas eletroforicamente, evidenciando a presença de anticorpos específicos. Serve para confirmar resultados duvidosos na sorologia convencional auxiliando na interpretação dos resultados (BYRNE, 1992; MEYER, 1996). Porém, como qualquer outro teste treponêmico pode permanecer reagente mesmo depois de tratamento eficiente e não permite diferenciar infecção atual de infecção passada (LARSEN, 1998).

Segundo critérios adotados na 9ª edição do Manual de Sífilis (LARSEN, 1998) a interpretação de um teste *Western blot* deve ser feita considerando a presença das bandas de 47, 17 e 15 kD considerando irrelevante a presença das bandas de 44,5 e 24 kD.

1.7.3. Detecção de ácidos nucleicos de *Treponema pallidum*

A partir dos trabalhos de Grimpel e Noordhoeck (LARSEN, 1998), o uso de técnicas altamente sensíveis e específicas de biologia molecular para detecção do DNA genômico de *Treponema pallidum* tem se mostrado como alternativa para a técnica de inoculação animal, principalmente porque permite obter resultados em curto prazo de tempo (CENTURION-LARA, 1997; WICHER, 1998).

A grande limitação dessas técnicas, no entanto, é a falta de correlação com a atividade da doença. Foi determinado por estudo de cinética, utilizando o teste de infecciosidade em coelhos (RIT), que a presença de *Treponema pallidum* é persistente em vários órgãos, em diferentes estágios da doença, em indivíduos tratados ou não. A detecção do microrganismo através do seu DNA, utilizando-se, por exemplo, técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), não permite a determinação de sua viabilidade (WICHER, 1998).

Para a avaliação dos testes de amplificação de ácidos nucléicos a técnica RIT é considerada de referência (LARSEN, 1990, 1998).

1.8. Respostas sorológicas

A partir de dados relativos ao comportamento dos anticorpos treponêmicos e não treponêmicos tanto na sífilis não tratada quanto na tratada na fase precoce ou no período tardio, PARIS-HAMELIN (1978) construiu as curvas características da resposta imune aos testes sorológicos na sífilis não tratada (figura 1), na sífilis tratada precocemente (figura 2) e na sífilis tratada tardiamente (figura 3). Além disso, essa autora demonstrou também na forma de curvas, a resposta sorológica verificada na transmissão passiva de anticorpos maternos ao feto (figura 4), e na sífilis congênita (figura 5).

As curvas iniciais (figuras 1, 2 e 3) evidenciam um período entre o contágio e o início da resposta sorológica, menor nas sorologias treponêmicas e maior na sorologia não treponêmica. A figura 1 mostra a evolução dos anticorpos no decurso da sífilis não tratada, em que os níveis de anticorpos após atingirem o pico máximo evoluem para um decréscimo estabilizando-se em cerca de 50% do nível inicial. A figura 2 caracteriza a evolução de uma sífilis tratada precocemente, evidenciando a negatificação nas sorologias treponêmicas e não treponêmicas.

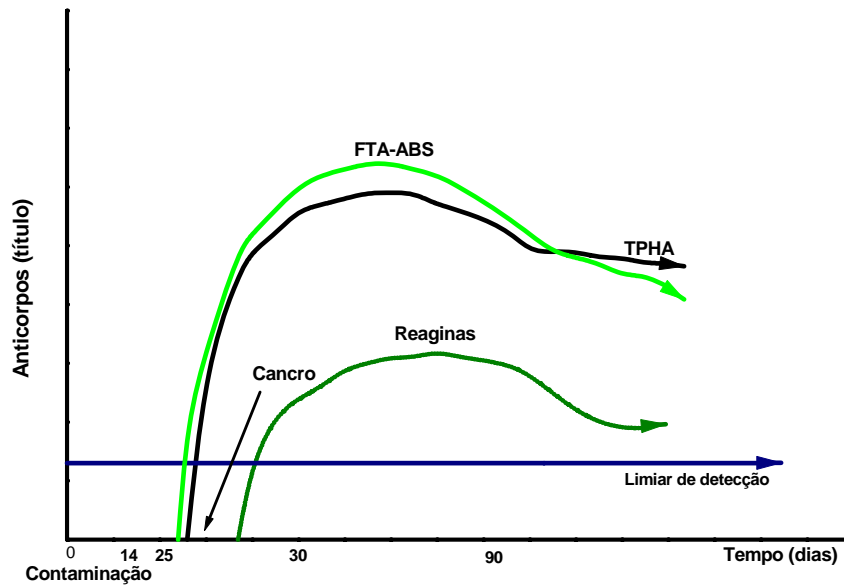
Finalmente, a curva 3 mostra que quando o tratamento é instituído após um certo tempo de doença, ainda não caracterizado, a resposta sorológica é duradoura, permanecendo como memória sorológica em níveis mais baixos de anticorpos, conhecida como cicatriz sorológica.

As respostas sorológicas, demonstradas por PARIS-HAMELIN (1978), conduzem a seguinte conclusão: “Quanto maior o tempo de evolução da doença, menor a probabilidade de negatificação sorológica”. Nos países em desenvolvimento é grande o número de pessoas com cicatrizes sorológicas, provocando inúmeras confusões na interpretação sorológica da sífilis.

A figura 4 mostra que os anticorpos IgG transferidos da mãe para o feto vão decrescendo gradativamente da circulação do recém nascido e após três meses não são mais detectáveis nos testes sorológicos.

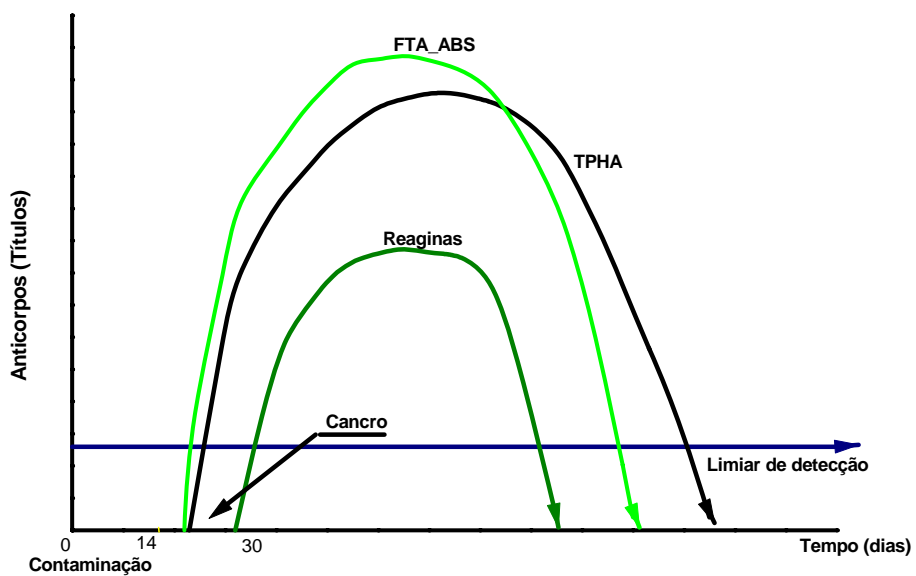
Na figura 5, pode-se verificar o comportamento dos anticorpos IgM e IgG. O nível de anticorpos IgG inicialmente está elevado, refletindo apenas a transferência de anticorpos maternos, entretanto em torno do terceiro mês, observamos a diminuição dos anticorpos de transmissão transplacentária, iniciando-se a produção de anticorpos IgG pela criança com conseqüente aumento do seu nível. A curva de anticorpos IgM produzidos pela criança passa por uma evolução ascendente nos três primeiros meses entrando em decréscimo quando do início de produção dos anticorpos IgG, pela criança.

Figura 1 – Comportamento dos anticorpos na sífilis não tratada.



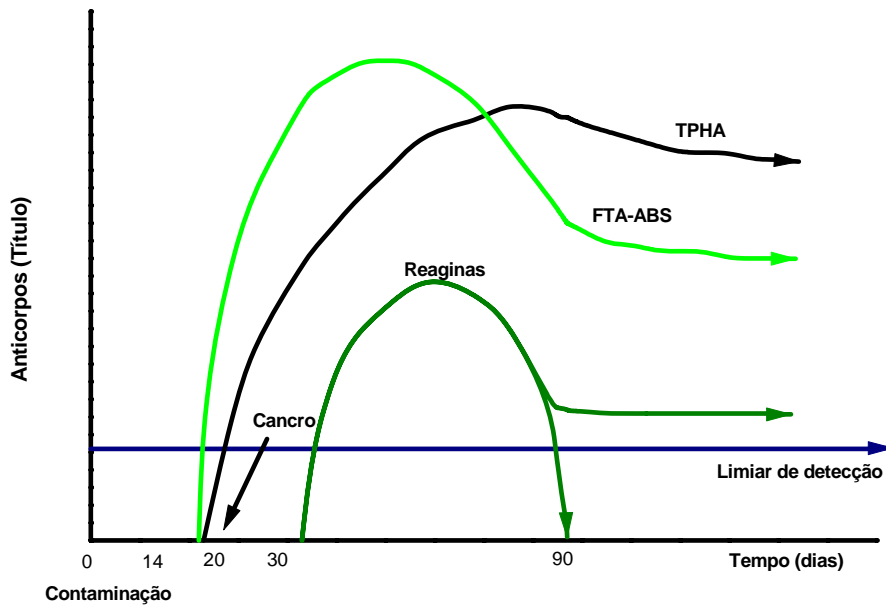
(PARIS-HAMELIN,1978)

Figura 2: Comportamento dos anticorpos na sífilis tratada precocemente.



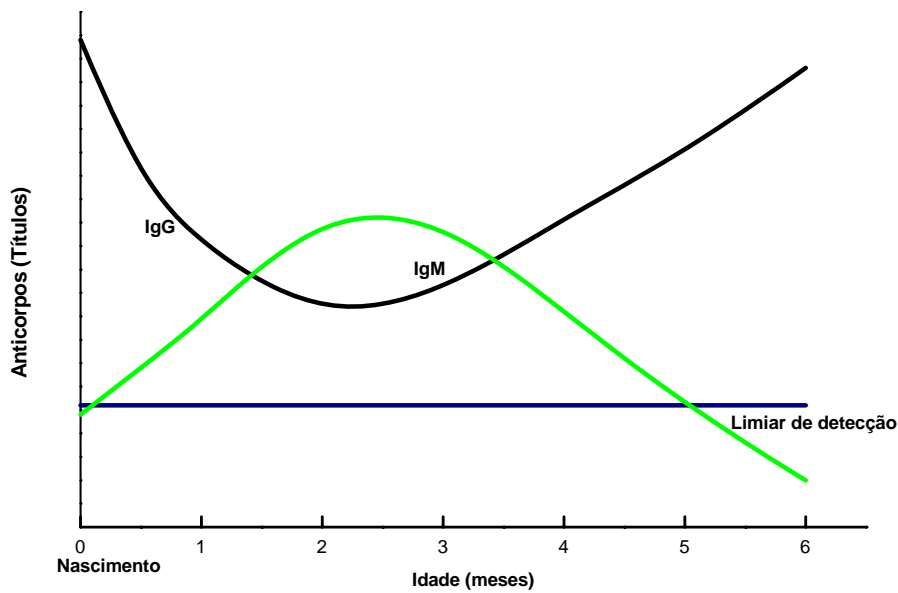
(PARIS-HAMELIN,1978)

Figura 3: Comportamento dos anticorpos na sífilis tratada tardiamente.



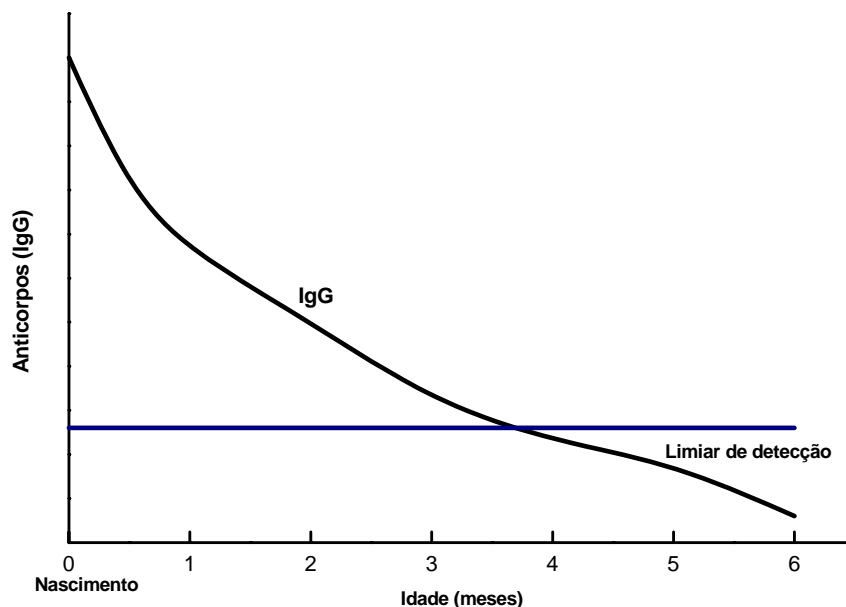
(PARIS-HAMELIN,1978)

Figura 4: Comportamento dos anticorpos na sífilis congênita.



(PARIS-HAMELIN,1978)

Figura 5: Comportamento dos anticorpos transferidos passivamente ao feto.



(PARIS-HAMELIN, 1978)

Devido ao comportamento atípico da sífilis, a grande expectativa clínica é a de que o diagnóstico laboratorial forneça respostas a importantes perguntas com o intuito de estabelecer as providências quanto ao tratamento e acompanhamento do paciente.

As principais perguntas clínicas são:

1. o paciente está infectado com *Treponema pallidum*?
2. o paciente está com uma infecção ativa?
3. precisa ser tratado?
4. em qual estágio da doença o paciente se encontra?
5. existe risco de neurosífilis?
6. é uma reinfecção com *Treponema pallidum*?
7. existe suspeita de sífilis congênita?
8. a terapia foi adequada?
9. o resultado da sorologia é uma cicatriz imunológica ou doença ativa?

E finalizando com as ansiedades mais atuais, no que diz respeito à compreensão do comportamento e da evolução sorológica da sífilis:

10. por que os pacientes coinfectados com HIV não respondem imunologicamente da mesma maneira?;

11. por que alguns pacientes não modificam o seu perfil sorológico após o tratamento?;

Algumas dessas dúvidas são facilmente respondidas, outras só encontrarão resposta na interação clínico-laboratório-paciente e finalmente outras necessitam de novos conhecimentos envolvendo o mecanismo imunológico para sua total compreensão (MEYER, 1994).

A sífilis é uma doença com características clínicas e sorológicas particulares, de complexa interpretação e certamente a única doença que tem sua triagem realizada com um teste inespecífico, ou seja, que não detecta a presença de anticorpos específicos contra a bactéria.

O teste não treponêmico VDRL, é muito simples, mas seus resultados podem apresentar-se de forma variada se não for seguida uma rigorosa padronização no preparo da suspensão antigênica, na inativação e na diluição dos soros, no tipo de placa de reação utilizada, no tempo e na velocidade de agitação da reação e no controle da temperatura ambiente (TELELAB, 1997, LARSEN, 1998). Essa padronização não é observada em muitos laboratórios, gerando diversos resultados quando uma mesma amostra é testada em diferentes locais (AEQ – Sífilis/CNDST e Aids, 1998). Outro dado importante refere-se a qualidade dos antígenos para VDRL comercializados ou fabricados no país que, conforme Nunes (1998) não fornecem o mesmo resultado quando uma amostra é testada, com diferentes antígenos, mesmo que em condições ideais.

Um dos fatores que provavelmente contribuíram para a escolha da triagem não treponêmica é o fato de que não existia um teste treponêmico ideal para triagem de amostras porque o FTA-ABS não é viável para grandes rotinas e a hemaglutinação não é sensível na sífilis primária. A partir da disponibilização dos testes ELISA treponêmicos, muitos laboratórios consideraram a possibilidade de selecionar os soros com essa metodologia e só realizar VDRL nas amostras

reagentes. Entretanto, os *kits* comerciais de ELISA treponêmicos ainda necessitam de avaliação mais minuciosa, principalmente quando eles são empregados em populações de baixa prevalência como por exemplo na triagem de doadores de sangue.

Além da possibilidade de automatização, o teste treponêmico apresentaria a vantagem de detectar a sífilis latente recente ou tardia, fase na qual existe o risco de transmissão por transfusão de sangue e a transmissão por via transplacentária é da ordem de 40% para sífilis latente recente e 10% para sífilis latente tardia (SINGH, 1999). Somados a esses fatos, o Brasil participa do protocolo da Organização Mundial de Saúde que pretende erradicar a sífilis congênita até o ano 2000 (TELELAB, 1997). A escolha de um método mais sensível eleva o número de casos diagnosticados, e possibilita o tratamento. Até 90% dos casos de sífilis congênita podem ser prevenidos com o tratamento da mulher durante a gravidez, no entanto, o tratamento inadequado ou o não tratamento requerem tratamento do recém nascido, com custo estimado, nos Estados Unidos, de \$ 12.000,00 por recém nascido (CDC, 1998 b).

Mesmo sabendo-se da eficiência da metodologia imunoenzimática para diagnóstico de muitas doenças, a proposta de utilizar esse método com antígeno treponêmico na triagem de amostras para sífilis significa uma mudança de conduta, em virtude do tipo de resposta sorológica observada com anticorpos treponêmicos e anticorpos não treponêmicos. O método imunoenzimático tem sempre sido escolhido como método de triagem devido sua rigorosa padronização, rapidez de execução se considerarmos o número de amostras testadas por um único técnico e principalmente por sua objetividade. No entanto, o teste VDRL vem sendo usado e aceito há pelo menos cinqüenta anos e sua substituição deve ser muito bem avaliada. Mesmo sabendo-se que algumas unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública têm adotado o teste imunoenzimático treponêmico, são poucos os resultados publicados. Dessa forma, esse trabalho tem o objetivo de conhecer o comportamento do teste ELISA, comparado com VDRL e FTA-ABS, em uma população de baixa prevalência.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o teste treponêmico imunoenzimático competitivo como método de triagem para o diagnóstico sorológico da sífilis.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Avaliar comparativamente o comportamento do teste imunoenzimático competitivo e do teste VDRL no processo de triagem sorológica para sífilis;
- 2.2.2. Estudo preliminar por *Western Blot* dos componentes antigênicos envolvidos no ELISA treponêmico competitivo.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Método

3.1. Casuística

Nos meses de julho, agosto e setembro de 1996, foram coletadas 23531 amostras de sangue de indivíduos do sexo masculino, com 18 anos de idade, que se alistaram no exército brasileiro (conscritos). As amostras coletadas integram o 1º corte do estudo conjunto entre o Ministério da Saúde e o Ministério do Exército para determinar a prevalência de infecção por HIV e sífilis nesta população.

Anualmente, cerca de 75000 conscritos procuram as Circunscrições Militares do Exército para fazer o alistamento militar. A seleção do número de amostras coletadas obedeceu um plano amostral por estratificação proporcional, sendo o primeiro estrato constituído pelas Regiões Sul e Sudeste e o segundo pelas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Em cada estrato, prosseguiu-se o processo amostral em dois estágios. No primeiro foram colhidas amostras nas Comissões de Seleção de cada Região Militar com probabilidade proporcional ao tamanho, em relação à distribuição de conscritos no ano anterior. A seguir os participantes foram escolhidos de maneira aleatória, de forma a se obter frações

amostrais semelhantes em cada comissão selecionada no primeiro estágio (Conhecimento sobre os meios de transmissão da Aids, 1998).

As amostras foram coletadas em 12 Regiões Militares (RM) do país, conforme representado na tabela a seguir:

Tabela 1: Distribuição das regiões militares e número de amostras coletadas.

Região Militar	Nº de Amostras	Estado(s)
1	3406	Rio de Janeiro, Espírito Santo
2	4539	São Paulo
3	924	Rio Grande do Sul
4	543	Minas Gerais
5	1628	Paraná, Santa Catarina
6	1776	Bahia, Sergipe
7	2940	Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte
8	1734	Pará, Amapá.
9	1111	Mato Grosso, Mato Grosso do Sul
10	1260	Ceará, Piauí, Maranhão
11	2232	Goiás, Tocantins
12	541	Rondônia
Outros	896	Sem informação
TOTAL	23531	

3.2. Material

3.2.1. VDRL

Conjunto Diagnóstico (*kit*) VDRL – Laborclin, lotes 60905 e 60915;

Componentes do *kit*:

- Antígeno concentrado (cardiolipina, colesterol e lecitina);
- Solução salina tamponada pH 6,0.

Agitador orbital plano tipo “Kline” ajustado para 180 rotações por minuto (rpm);

Microscópio óptico comum, Studar, com objetiva 20X e ocular 10X;

Solução salina – NaCl 0,9%;

Placas de vidro, com 12 orifícios planos de 14 mm de diâmetro cada;

Agulha 18 G, sem bisel (60 gotas /ml), acoplada a seringa de vidro de 1 ml.

3.2.2. FTA-ABS

Antígeno IMUNO pallidum, Biolab, lote 70612;

Extrato de Treponema de Reiter, Biolab, lote 470761;

Solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2;

Conjugado anti-humano/FITC, BioManguinhos, lote 090040297;

Azul de Evans 0,04%;

Glicerina tamponada pH 9,0;

Lamínulas 24X60 mm;

Microscópio de fluorescência Zeiss, modelo Axiolab, equipado com lâmpada HBO 50.

3.2.3. ELISA - Competitivo

Conjunto diagnóstico (*kit*) Trepanostika™ - Organon lotes B 067 e B 069;

Componentes do *kit*

- Antígeno: *T. pallidum* inativados por ultrassom. Esse antígeno foi utilizado para sensibilizar placas de microtitulação de poliestireno com 12 tiras removíveis, contendo 8 poços cada tira;
- Controle Negativo: Soro bovino, não reagente para anticorpos anti – *Treponema pallidum*. Preservado com thimerosal e fenol;
- Conjugado: Anticorpos humanos totais (IgG e IgM) anti – *Treponema pallidum* marcados com enzima peroxidase (Horseradish peroxidase – HPR). Preservado com thimerosal e fenol;
- Substrato – Cromógeno: Tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio em tampão citrato;
- Solução de Parada da reação enzimática: Ácido sulfúrico 0,5 mol/l;
- Solução de Lavagem: Solução salina tamponada com fosfatos. Preservada com brij e thimerosal.

Todos os reagentes são prontos para uso com exceção da solução de lavagem que deve ser diluída a 1/10 em água destilada ou deionizada.

Incubadora: Incubator Shaker 50 X

- Temperatura de incubação 37° C;
- Agitação: 900 rpm.

Lavadora: Washer 430

- Ciclos de lavagem: 4;
- Tempo de repouso (soak time): 30 segundos.

Leitora: Manual Reader 230 S

- Filtro de leitura: 450 nanômetros;
- Filtro de referência: 620 nanômetros.

3.2.4. Western blot

Fitas de nitrocelulose contendo antígenos de *Treponema pallidum*, separados eletroforeticamente, segundo LAEMMLI, 1970 E TOWBIN, 1979.

3.3. Métodos

3.3.1. Coleta e separação das amostras

As amostras foram coletadas por punção venosa e após sua coagulação, foram centrifugadas. O soro separado foi distribuído em duas alíquotas, uma para a pesquisa de anticorpos anti-HIV e outra para o diagnóstico sorológico da sífilis.

As amostras foram distribuídas em flaconetes plásticos com tampa rosqueável, resistentes ao congelamento (criotubos).

3.3.2. Identificação das amostras

Durante todo o estudo, foi mantido absoluto anonimato quanto à identidade dos conscritos. Os soros para sífilis foram identificados, durante a coleta, com o número do Cadastro do Alistamento Militar - CAM de cada conscrito. Para esse estudo, porém, receberam identificação numérica crescente, a partir do número 1. Essa nova identificação desvinculou os soros de qualquer relação com o CAM.

3.3.3. Transporte e conservação das amostras

Os soros, para o diagnóstico sorológico da sífilis, foram enviados para o Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

O transporte dos soros foi realizado por via aérea. Estes foram acondicionados congelados em caixas térmicas a temperatura de 2° a 8° C,

chegando ao destino no prazo máximo de 24 h, onde foram congelados a -20°C até a realização dos testes.

3.3.4. Procedimentos metodológicos

Todos os soros foram submetidos ao teste não treponêmico VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) e a um teste treponêmico ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de competição – Trepanostika[™] - Organon.

A triagem dos soros com o teste não treponêmico VDRL e a confirmação com o teste treponêmico FTA-ABS foi realizada no período de abril e maio de 1997. Os testes imunoenzimáticos (ELISA) foram iniciados a partir de julho de 1997. Os testes FTA-ABS nos soros reagentes no ELISA foram realizados paralelamente aos testes enzimáticos. Os testes FTA-ABS, em amostras não reagentes tanto no VDRL quanto no ELISA, foram realizados após o término de todas os testes ELISA.

Todos os soros reagentes no teste não treponêmico e/ou no teste ELISA foram submetidos ao FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody Absorption). Foram testados também, por imunofluorescência soros negativos nos testes VDRL e ELISA, num total de 1120 FTA-ABS realizados.

3.3.4.1. VDRL

3.3.4.1.1. Soros controle para VDRL

O controle da reação foi feito com a utilização de um soro não reagente e um soro reagente, com título 1/16.

Soro controle não reagente:

Esse controle foi preparado a partir da identificação de soros não reagentes entre as amostras da rotina do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram testados em triplicata, com suspensão antigênica preparada com antígeno do mesmo lote utilizado para triagem dos soros. Todos os soros não reagentes, em triplicata, foram separados em alíquotas de 200µl, que foram mantidas congeladas a -20° C.

Soro controle reagente:

O soro reagente foi preparado a partir de uma bolsa de plasma reagente para sífilis e não reagente para HIV, HBsAg, Anti-HBC, HTLVII/III e Doença de Chagas. O plasma foi descongelado à temperatura ambiente (22o C), filtrado e recalcificado com cloreto de cálcio, de acordo com protocolo da Organização Mundial de Saúde. Com o soro obtido, após a recalcificação, foi realizado VDRL quantitativo, em triplicata, com a suspensão antigênica preparada com antígeno do mesmo lote utilizado para triagem dos soros. Após a determinação do título, o soro foi separado em alíquotas de 200µl que foram mantidas congeladas a -20o C.

3.3.4.1.2. Suspensão antigênica

O preparo da suspensão antigênica seguiu as instruções do fabricante (Anexo 1). Essas instruções estão de acordo com o “Manual of Testes for Syphilis”, publicação da Associação Americana de Saúde Pública (LARSEN, 1990).

3.3.4.1.3. Controle da suspensão antigênica

Toda suspensão antigênica prepara era testada com os soros controle. Se o soro controle negativo mostrasse qualquer aglutinação de cristais do antígeno (rugosidade, conforme descrito por LARSEN, 1990, 1998), diferente da recomendação do fabricante ou se o título do soro controle reagente não correspondesse a 1/16, a suspensão era desprezada e nova suspensão preparada e testada com os controles.

3.3.4.1.4. Reação

Todos os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos e reativados por 10 minutos a 56°C quando a reação foi executada após 4 horas da inativação. A triagem foi feita com os soros puros e na diluição 1/16, para evitar ocorrência de reações falso-negativas (fenômeno de pró-zona).

A reação de VDRL foi realizada com 50 µl dos soros e das diluições, em placas de vidro, com 12 orifícios planos de 14 mm de diâmetro cada. A suspensão antigênica foi adicionada com o auxílio de uma seringa de vidro de 1ml conectada a uma agulha 18 G sem bisel (60 gotas/ml). A agitação da reação foi feita em agitador orbital plano (tipo Kline) a 180 rotações por minuto (rpm) durante 4 minutos. Imediatamente após o término da agitação as reações foram lidas em microscópio óptico comum (Studar) com objetiva 20X e ocular 10X.

Os soros reagentes na triagem foram submetidos ao teste VDRL quantitativo. Nesse teste, foi utilizado o soro puro e em diluições seriadas, na

razão 2, no número de diluições necessárias para determinação do título, inicialmente seis diluições, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64 respectivamente e novamente realizada com diluições maiores quando necessário (títulos iguais ou maiores do que 64).

3.3.4.2. FTA-ABS

Esse teste foi utilizado como referência (padrão ouro) (LARSEN, 1998).

3.3.4.2.1. Fixação do antígeno

As lâminas de vidro com aproximadamente 1 mm de espessura e 12 demarcações, foram lavadas com detergente neutro, enxaguadas exaustivamente em água corrente, em seguida em água destilada e secas uma a uma.

O antígeno *T. pallidum* foi hidratado e fixado nas lâminas de acordo com as recomendações do fabricante. Após secas, as lâminas contendo o antígeno foram enroladas individualmente em papel alumínio, guardadas em frasco de vidro com tampa hermética e mantidas a -20°C .

3.3.4.2.2. Soros controle para FTA-ABS

Para controle dessa reação foram utilizados: um soro não reagente, um soro reagente com reatividade moderada (2+ de fluorescência) e outro soro reagente com reatividade intensa (4+ de fluorescência). Esses soros foram selecionados da rotina do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário. Após selecionados, foram testados em triplicata. Os soros que mantiveram o padrão de reatividade esperado foram separados em alíquotas de 100 μl cada e mantidos congelados a -20°C .

3.3.4.2.3. Controle da reação de FTA-ABS

Os protocolos de reação foram elaborados para que toda lâmina contivesse controles positivo e negativo. Em algumas lâminas o controle negativo foi substituído por extrato de treponemas de Reiter. O controle positivo de reatividade forte (4+) e o controle de reatividade moderada (2+) foram distribuídos alternadamente. O soro controle negativo e o extrato de treponema de Reiter também foram distribuídos alternadamente.

3.3.4.2.4. Reação

Os soros foram reativados a 56° C por 10 minutos, quando foi utilizada a alíquota do VDRL, previamente inativada ou inativados a 56° C por 30 minutos, quando obtidos do criotubo original.

o teste FTA-ABS foi realizado com os soros diluídos a 1/5 em Extrato de Treponema de Reiter, e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente para adsorção dos anticorpos de grupo, responsáveis por reações falso positivas.

Após a adsorção, 15µl de cada amostra assim como de cada controle foram distribuídos nas lâminas, seguindo o protocolo previamente estabelecido. A incubação das lâminas foi feita em câmaras úmidas a 37° C por 30 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas, em três banhos de 5 minutos cada, em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2, e secas por 10 minutos a 37° C.

O Conjugado (Bio Manguinhos), previamente titulado, foi diluído a 1/150 em azul de Evans 0,04%. Quinze microlitros desse conjugado diluído foi distribuído em cada demarcação das lâminas, que foram novamente incubadas em câmaras úmidas a 37° C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em banhos de PBS, conforme acima descrito. Após o último banho, foram lavadas rapidamente em água destilada e secar por 10 minutos a 37° C. As lâminas foram montadas com duas a três gotas de glicerina tamponada pH 9,0 e lamínula 24X60 mm. A leitura das reações foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss), com objetiva de 40X e ocular de 10X.

3.3.4.3. Teste imunoenzimático

Foi utilizado um teste imunoenzimático do tipo ELISA competitivo (Trepanostika™ - Organon), destinado à pesquisa anticorpos totais (IgG e IgM) anti - *Treponema pallidum*.

3.3.4.3.1. Soros Controle para ELISA

Inicialmente foram utilizados os controles positivos preparados para o FTA-ABS. Posteriormente foram selecionados soros positivos da própria triagem por ELISA, que foram separados em alíquotas de 60µl e estocadas a – 20° C.

3.3.4.3.2. Controle do teste imunoenzimático

O controle negativo utilizado foi o fornecido pelo fabricante. Três alíquotas foram testadas em cada placa.

O conjunto diagnóstico não forneceu controle positivo e nem mencionou a necessidade de uso. No entanto, considerando necessário, utilizamos em todas as placas, um soro positivo como controle.

3.3.4.3.3. Reação

Todos os soros testados por VDRL foram também testados por ELISA competitivo. Os protocolos foram organizados com três controles negativos, um controle positivo e 92 soros.

Trinta microlitros de cada controle e de cada soro, foram pipetados nas placas de 96 poços. Em seguida foram acrescentados 100 µl de conjugado em cada cavidade. As placas foram cobertas com etiquetas gomadas, agitadas a 900 rpm por 15 segundos e incubadas (Incubator Shaker 50 X) por 90 minutos a 37° C. Em seguida foram lavadas (Washer 430), com solução de lavagem, em 4 ciclos de 300 µl em cada poço, com tempo de repouso (“soak time”) de 30 segundos. As placas foram batidas contra papel absorvente para retirada de solução de lavagem residual. E em seguida, foram adicionados 100 µl de substrato. Nesta etapa de

desenvolvimento de cor, as reações foram incubadas a temperatura ambiente, no escuro, por 15 minutos. As reações enzimáticas foram interrompidas com adição de 100 µl de solução de ácido sulfúrico 0,5 M. As placas foram lidas em espectrofotômetro (Manual Reader 230 S) com filtro de leitura selecionado em 450 nm e filtro de referência em 620 nm. A intensidade de cor é inversamente proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra.

Os resultados foram interpretados e comparados com os resultados do VDRL e FTA. Os soros considerados indeterminados ou discordantes foram repetidos.

3.3.4.3.4. Validação do Teste e Cálculo do Limiar de reatividade (LR)

Os testes foram validados se as densidades ópticas (DO) dos soros controle negativos estivessem entre 0.600 e 1.300.

O LR de cada reação foi calculado de acordo com as instruções do fabricante. Esse valor era obtido multiplicando-se a média aritmética das DO dos controles negativos por 0,7 ($X_{DOCN} \times 0,7$). A zona cinza ou “borderline” incluía os resultados encontrados entre o valor do LR e do LR menos 10%. O cálculo do LR menos 10% foi feito pela multiplicação da média aritmética das DO dos controles negativos por 0,63 ($X_{DOCN} \times 0,63$). Dessa maneira, foi considerado indeterminado qualquer soro com DO na zona cinza. Soros com DO inferior a essa zona foram considerados reagentes e com DO superior a do LR foram consideradas não reagentes.

3.3.4.3.5. Controle de Qualidade dos Testes Imunoenzimáticos

A tabela 2 apresenta o desempenho dos dois lotes do *kit* Trepanostika, testados com o painel composto de 25 soros regentes para sífilis, produzido pela empresa Boston Biomedica Inc. (BBI), denominado “Syphilis Mixed Titer Performance Panel PSS201”. A caracterização completa do painel está apresentada no Anexo 2.

Tabela 2: Desempenho dos lotes B-067 e B-069 do kit Trepanostika™ comparado com o resultado dos testes treponêmicos utilizados na caracterização do painel “Syphilis Mixed Titer Performance Panel PSS201”.

Amostra (Número)	Tipo	FTA..abs (Scclinodx)	FTA-ABS (Zeub)	ELISA IgG** (Centocor)	Lote B 067 (Trepanostika)	Lote B 069 (Trepanostika)
PSS201- 01	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 02	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 03	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 04	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201 -05	Soro	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente
PSS201- 06	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 07	Plasma	Reagente*	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 08	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 09	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 10	Plasma	Reagente*	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 11	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 12	Soro	Reagente*	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 13	Soro	Reagente*	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 14	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 15	Plasma	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Não reagente
PSS201- 16	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 17	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 18	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 19	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 20	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 21	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 22	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 23	Soro	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 24	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente
PSS201- 25	Plasma	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	Reagente

* Reatividade Mínima

** A relação DO/LR está apresentada no Anexo 2

3.3.4.4. *Western blot*

3.3.4.4.1. Estudo de fatores interferentes

Antes da realização do teste propriamente dito foi feito um estudo piloto para verificar a possibilidade de se empregar a técnica para análise de alguns soros desse trabalho. Na preparação das tiras, para o estudo piloto, foi utilizado o antígeno comercial liofilizado Imuno Pallidum cepa Nichols, Biolab, normalmente utilizado para o testes FTA-ABS.

Para obter a concentração necessária de treponemas o antígeno foi hidratado com 0,2 ml de água destilada. Foram realizadas algumas corridas eletroforéticas, em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com diferentes diluições do antígeno. A diluição escolhida foi: 1 parte de tampão de amostra 5X concentrado + 4 partes de antígeno + 20 µl de 2-mercaptoetanol (2-Me). O antígeno foi fervido com o tampão de amostra e o 2-Me por 3 minutos.

O antígeno, o padrão de peso molecular e um padrão isolado de 67 kD (albumina) foram submetidos à eletroforese em um sistema contínuo de separação, com gel de empilhamento a 3,75% (pH 6,8) e gel de separação a 12% (pH 8,8). Nessa corrida foi aplicado 50 V até que a amostra ultrapassasse o gel de empilhamento e 120 V até o término da corrida.

As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm, com corrente de 1 mA por cm² durante 2 h e 30 minutos, utilizando uma cuba de transferência Pharmacia LKB - Multiphor II.

O gel foi corado com Coomassie blue R. A fita de nitrocelulose foi corada em Ponceau 0,5% por 2 minutos, descorada em água destilada e utilizada para a reação de *Western blot*.

O gel corado mostrou presença de grande quantidade de proteínas na faixa de 67 kD, provavelmente devido à adição de albumina durante o processamento do antígeno pelo fabricante.

As reações de *Western blot* foram realizadas com três soros assim caracterizados:

Soro 1: Reagente até a diluição 1/64 no VDRL e reagente no FTA-ABS;

Soro 2: Reagente até a diluição 1/4 no VDRL e reagente no FTA-ABS;

Soro 3: Não reagente no VDRL e no FTA-ABS.

Os soros 1 e 3 foram testados nas diluições 1/20 e 1/40. O soro 2 foi testado apenas na diluição 1/20.

3.3.4.4.2 *Western blot* com *T. pallidum* obtidos de orquite

O preparo das tiras de nitrocelulose com as proteínas de *Treponema pallidum* e a reação seguiram os procedimentos adotados no estudo piloto, com as seguintes modificações:

- O antígeno utilizado foi *T. pallidum* obtido de bolsas escrotais de 20 coelhos infectados, gentilmente cedidos pelo Laboratório Biolab Mérieus de São Paulo;
- Devido a quantidade de proteínas separadas, decidiu-se trabalhar com gel grande (9 X 14 cm);
- O volume de antígeno utilizado foi de 15 µl, a partir de uma suspensão de 100 µl de treponemas obtidos de 20 coelhos, diluído em 128 µl de tampão de amostra 5 vezes concentrado;
- Foi utilizado um pente de teflon de três dentes. Os dentes tinham tamanhos diferentes medindo 0,5 cm, 10,5 cm e 0,5 cm. O padrão de pesos moleculares e o padrão isolado foram colocados nos dentes de 0,5 cm e o antígeno no dente de 10,5 cm;
- Os soros controle de números 1 e 3 foram mantidos e o de número 2 foi substituído por outro soro não reagente;
- Os soros e os controles foram inativados e diluídos na proporção de 1/5, em extrato de treponemas de Reiter. Após adsorção foram diluídos para um volume final de 1/50.

3.3.2.4.3. Reação

As tiras foram cortadas e colocadas em solução salina tamponada (PBS) pH7,2 por 10 minutos. O bloqueio das tiras foi feito com solução de leite desnatado a 5% em PBS durante 1 hora. Em seguida a solução bloqueadora foi desprezada e 0,8 ml de cada controle e cada soro foram adicionados, nas fitas previamente identificadas. As cubas de reação foram tampadas e mantidas sob agitação durante 1 h a 37° C. Em seguida as fitas foram lavadas, primeiro com PBS, por um minuto e depois em 3 banhos de 2 minutos cada com PBS contendo 0,05% de *Tween 20*. Por fim foram lavadas por 2 minutos com solução de leite desnatado a 1% em PBS (PBS-L 1%).

O conjugado enzimático foi diluído a 1/3000 em PBS-L 1%. Oitocentos microlitros desse conjugado foram adicionados às fitas. As cubas foram tampadas e incubadas sob agitação a 37° C por uma hora. Em seguida, as fitas foram lavadas seguindo os procedimentos de lavagem já mencionados. A revelação das reações foi feita com 100 mg do cromógeno diamino benzidina (DAB) diluído em 60 ml de PBS e adicionado de 300 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, o substrato enzimático. O bloqueio da reação enzimática foi feito com água destilada.

As fitas foram secas. Foi calculada a mobilidade relativa de cada banda e a massa molecular foi determinada com auxílio do gráfico construído com o padrão de peso molecular.

3.3.5. Organização dos dados

Os dados foram organizados em um banco de dados programado em Delphy com extensão.dbf, linguagem que permite seu transporte para os programas de análise estatística que capturam arquivos com extensão.dbf.

A entrada dos dados foi feita inicialmente com os resultados do VDRL e depois com os do FTA-ABS. Posteriormente foram digitados os resultados dos testes imunoenzimáticos e os resultados de outras amostras testadas por FTA-ABS.

O banco de dados foi programado de forma que se pudesse obter vários tipos de relatórios, como por exemplo, a identificação das amostras segundo título do VDRL, juntamente com os resultados do FTA-ABS e ELISA; ou a identificação das amostras reagentes no ELISA, com os resultados do VDRL e FTA-ABS, e também o cruzamento de todas as variáveis.

Os cálculos dos intervalos de confiança (95%) seguiram o método de Wilson de proporções para distribuição não paramétricas, descrito em Rothman e Boice.

RESULTADOS

4. Resultados

Nas 23.531 amostras testadas, foi encontrada soro prevalência da sífilis de 0,63% no teste VDRL e de 0,84% no ELISA.

O teste de imunofluorescência indireta FTA-ABS foi considerado teste de referência ou padrão ouro para cálculo dos valores da sensibilidade e especificidade relativas dos testes realizados. Esse teste foi realizado em 1120 amostras, incluindo todas as reativas em qualquer dos outros dois testes e em amostras não reagentes na triagem. Apesar da amostragem de 23531 soros com resultados de VDRL e ELISA, o cálculo de sensibilidade e especificidade foi determinado considerando as 1120 amostras com resultados obtidos no teste de FTA-ABS. Na tabela 1 estão apresentados os valores de sensibilidade e especificidade relativas do teste treponêmico imunoenzimático competitivo.

Para determinação desses valores, 11 soros com resultados indeterminados no ELISA foram eliminados do cálculo. Dos 1109 restantes, 2 apresentaram resultados falso positivos e 22 resultados falso negativos. A sensibilidade relativa do ELISA foi de 89,95% e a especificidade relativa de 99,78%.

Tabela 1 - Valores de sensibilidade e especificidade do ELISA em relação ao teste de referência FTA-ABS

	FTA +	FTA -	Total
ELISA +	197	2	199
ELISA -	22	888	910
Total	219	890	1109

Eficiência ou Concordância = $(197 + 888) / 1109 = 0,98$

Sensibilidade = $(197 / 219) \times 100 = 89,95\%$ Falso Negativo 10 % (22 / 219)

Especificidade = $(888 / 890) \times 100 = 99,78\%$ Falso Positivo 0,22 % (2 / 890)

Observação: 7 soros com perfil **FTA-ABS positivo** e **ELISA Indeterminado** e 4 soros com **FTA-ABS negativo** e **ELISA Indeterminado** foram excluídos do cálculo.

Na população estudada, constituída por 1.120 amostras, o teste não treponêmico VDRL apresentou 23 soros com resultados falso-positivos e 101 soros com resultados falso negativos. Assim, a sensibilidade desse teste foi de 55,11% e a especificidade foi de 97,43%. Os dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de sensibilidade e especificidade do teste VDRL em relação ao teste de referência FTA-ABS

	FTA +	FTA -	Total
VDRL +	124	23	147
VDRL -	101	872	973
Total	225	895	1120

Eficiência ou Concordância = $(124 + 872) / 1120 = 0,89$

Sensibilidade = $(124 / 225) \times 100 = 55,11\%$ Falso Negativo 44,89 % (101 / 225)

Especificidade = $(872 / 895) \times 100 = 97,43\%$ Falso Positivo 2,57 % (23 / 895)

Os dados da tabela 3 mostram o comportamento do teste imunoenzimático competitivo em amostras reagentes tanto no teste não treponêmico VDRL quanto no teste treponêmico FTA-ABS. Nessas 124 amostras consideradas verdadeiramente positivas, observa-se concordância do ELISA em 105 (84,7%), enquanto 14 (11,3%) apresentaram resultados falso negativos e 5 (4,0%) resultados repetidamente indeterminados.

Tabela 3 - Comparação dos resultados do ELISA com 124 soros reagentes nos testes VDRL e FTA-ABS

Resultado do ELISA	Título do VDRL									Total
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
Reagente (Nº de soros)	03	14	18	22	22	11	09	04	02	105
Não reagente (Nº de soros)	04	03	04	03	-	-	-	-	-	14
Indeterminado (Nº de soros)	-	02	03	-	-	-	-	-	-	05
Total	07	19	25	25	22	11	09	04	02	124

Amostras não-reagentes foram repetidas também após inativação, permanecendo o resultado.

A tabela 4 mostra o comportamento do teste imunoenzimático competitivo quando comparado com amostras falso positivas que se apresentaram reagentes no teste não treponêmico VDRL e não reagentes no teste treponêmico FTA-ABS. Nesse grupo de 22 amostras, o ELISA concordou em 100% com o resultado do FTA-ABS, fornecendo 100% de resultados negativos, independentemente do título do VDRL.

Tabela 4 – Comparação dos resultados do ELISA em 22 soros reagentes no teste VDRL e não reagentes no teste FTA-ABS

Resultado do ELISA	Título do VDRL		
	1/1	1/2	Total
Reagente (Nº de soros)	-	-	-
Não reagente (Nº de soros)	17	06	23
Indeterminado (Nº de soros)	-	-	-
Total	17	06	23

A tabela 5 apresenta o comportamento do teste imunoenzimático competitivo em soros não reagentes no teste não treponêmico VDRL porém reagentes no teste treponêmico FTA-ABS, indicando sensibilidade muito superior do que a do teste VDRL.

Tabela 5 – Comparação dos resultados do ELISA com 98 soros não reagentes no teste VDRL e reagentes no teste FTA-ABS

Resultado do ELISA	Número de soros VDRL não reag. e FTA reag.
Reagente	92 (91,0%)
Não reagente	02 (2,0%)
Indeterminado	07 (7,0%)
Total	101 (100%)

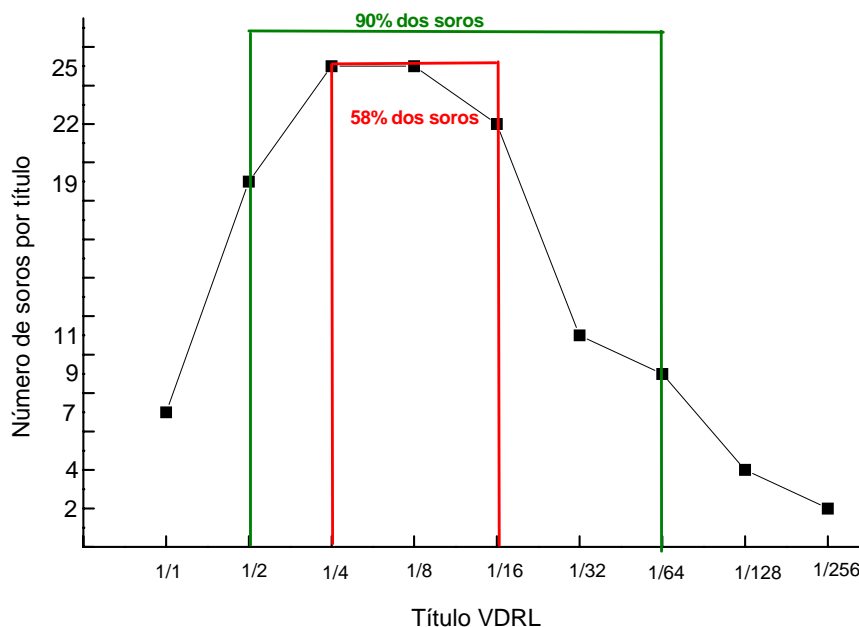
A tabela 6 apresenta a comparação dos resultados do teste imunoenzimático competitivo em soros não reagentes no teste não treponêmico VDRL e não reagentes no teste treponêmico FTA-ABS. No estudo do grupo de 872 soros, a concordância do ELISA com os soros não reagentes nos testes VDRL e FTAS-ABS foi de 99,3% (866 soros), a discordância foi de 0,5%, por conta de resultados falso-positivos (4 soros). Resultados indeterminados foram observados em 0,2% (2 soros).

Tabela 6 - Comparação dos resultados do teste ELISA nos soros com VDRL não reagente e FTA-ABS não reagente

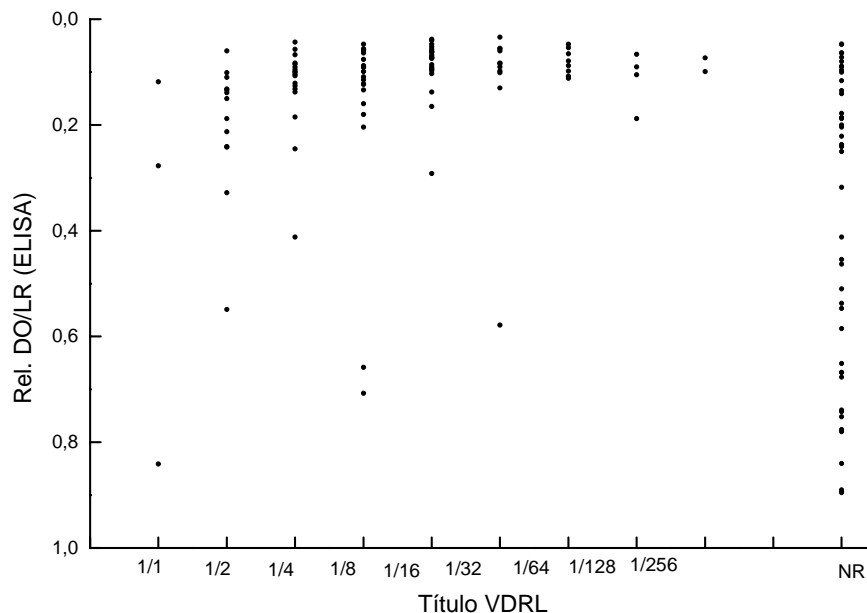
Resultado do ELISA	Número de soros
	VDRL não reag. e FTA não reag.
Reagente	04 (0,5%)
Indeterminado	02 (0,2%)
Não Reagente	866 (99,3%)
Total	872 (100%)

A figura 6 apresenta a distribuição dos títulos de VDRL nos 124 soros considerados verdadeiro-positivos porque apresentaram resultados reagentes tanto no teste não treponêmico VDRL, quanto no teste treponêmico de referência FTA-ABS. O VDRL apresentou títulos que variaram de 1/1, amostras puras ou não diluídas, até 1/256. O maior número de amostras, no entanto apresentou títulos entre as diluições 1/2 e 1/64. Essa faixa de títulos compreendeu 90% dos soros. Em uma análise mais cuidadosa verifica-se que dentro dessa faixa, 58% dos soros apresentaram resultados em títulos de 1/4, 1/8 e 1/16, com distribuição aproximadamente equivalente de 20,2%, 20,2% e 17,7% respectivamente. Noventa por cento dos resultados ficaram compreendidos entre 1/4 e 1/64.

Figura 6 – Distribuição dos títulos de VDRL em 124 soros reagentes

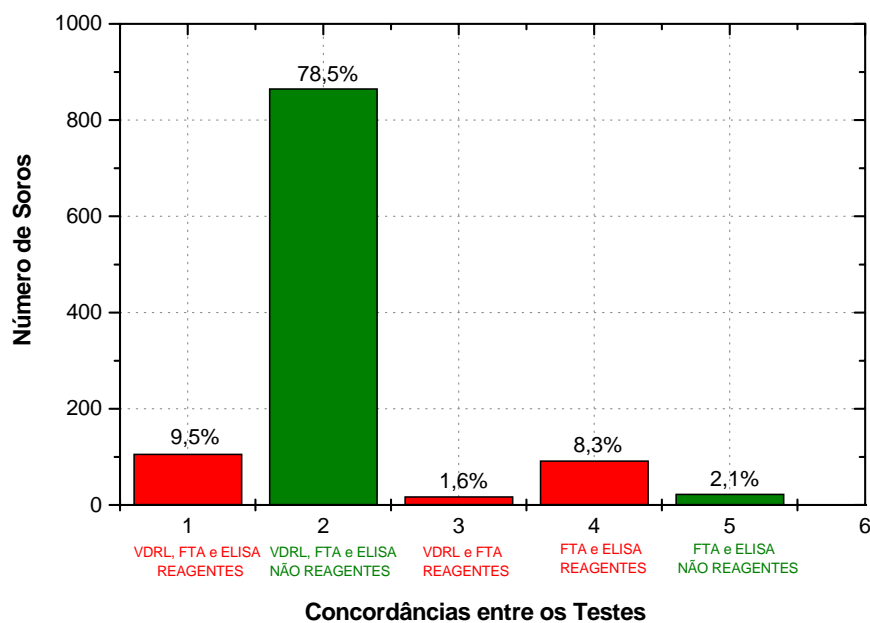


Na figura 7 observa-se a distribuição da relação entre a densidade ótica e o limite de reatividade dos testes imunoenzimáticos (rel. DO/LR) em soros não reagentes e reagentes em diversos títulos, no teste VDRL. Inicialmente foram determinadas as rel. DO/LR das amostras com resultados concordantes entre os três testes. Essas relações foram distribuídas no gráfico de acordo com o título que apresentaram no VDRL, verificando-se uma tendência de baixas rel. DO/LR, em quase todos os resultados, independente de título. A determinação da rel. DO/LR em amostras que apresentaram resultado reagente no ELISA e não reagente no VDRL confirmam a observação de que não há correlação entre esse índice e o título do VDRL, pois nessas amostras onde o VDRL foi não reagente, obteve-se relações tão baixas como aquelas verificadas em altos títulos de VDRL.

Figura 7 - Distribuição da relação DO/LR nos diferentes títulos de VDRL

A figura 8 mostra as concordâncias verificadas entre os resultados dos três testes. Das 1120 amostras submetidas aos testes VDRL, FTA-ABS e ELISA, 1105 tiveram seus resultados apresentados. As outras 15 amostras foram excluídas, porque apresentaram resultados discordantes nos testes VDRL e FTA-ABS, com ELISA indeterminado (11 amostras) ou porque apresentaram reatividade só no teste FTA-ABS (4 amostras). Entre as amostras com resultados concordantes 78% (866 / 1105) foram não reagentes nos três testes, 9,5% (105 / 1105) foram reagentes nos três testes, 1,6% (18 / 1105) foram reagentes nos testes VDRL e FTA-ABS, 8,3% (92 / 1105) foram reagentes nos testes FTA-ABS e ELISA e 2,1% (23 / 1105) foram não reagentes nos testes FTA-ABS e ELISA.

Figura 8 – Concordâncias entre os resultados dos testes nas amostras testadas com VDRL, FTA-ABS e ELISA



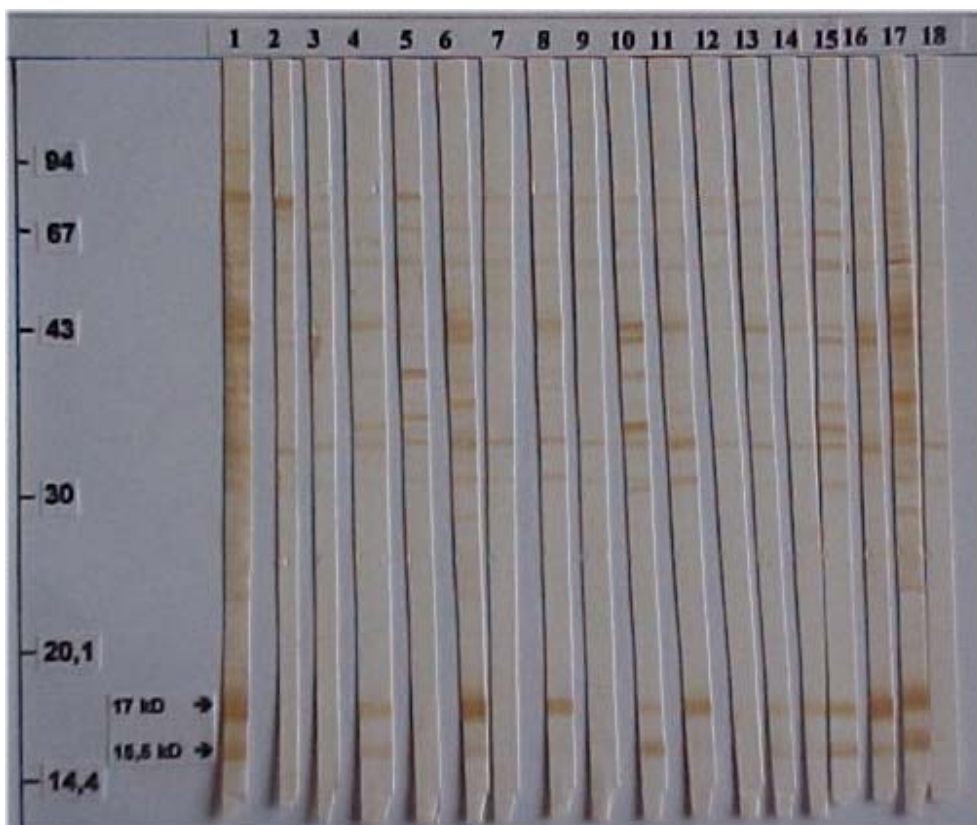
A tabela 7 apresenta os resultados dos testes VDRL e ELISA treponêmico em cada Região Militar. Os valores percentuais totais (*) dos dois testes são ligeiramente superiores aos percentuais mostrados no início da apresentação dos resultados porque, quando as amostras estão divididas por Região Militar, não são consideradas as 896 amostras que constam na Tabela 1 como “Outros”, ou seja, amostras cuja Região Militar não foi identificada. Nenhuma dessas 896 amostras foi reagente e por isso observa-se a diferença de 0,63% de positividade para o teste VDRL no total de 23.531 amostras e de 0,65% no total de 22.634 amostras. O mesmo ocorre no ELISA, com positividade de 0,84% no total de 23.531 amostras e de 0,88% no total de 22.634 amostras.

Tabela 7 – Distribuição da reatividade dos testes VDRL e ELISA treponêmico em cada Região Militar

Região Militar	Número de Soros Reagentes no Teste VDRL	Número de Soros Reagentes no Teste ELISA	Total de Soros Coletados
1 – Rio de Janeiro e Espírito Santo	33 (1,0%)	40 (1,2%)	3.406
2 – São Paulo	11 (0,2%)	14 (0,3%)	4.539
3 – Rio Grande do Sul	04 (0,4%)	06 (0,6%)	924
4 – Minas Gerais	ZERO	03 (0,5%)	543
5 – Paraná e Santa Catarina	10 (0,6%)	09 (0,6%)	1.628
6 – Bahia e Sergipe	08 (0,4%)	14 (0,7%)	1.776
7 – Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Rio Grande do Norte	25 (0,8%)	40 (1,3%)	2.940
8 – Pará e Amapá	24 (1,4%)	34 (1,9%)	1.734
9 – Mato Grosso e Mato Grosso do Sul	04 (0,4%)	06 (0,5%)	1.111
10 – Ceará, Piauí e Maranhão	07(0,5%)	10 (0,7%)	1.260
11 – Goiás e Tocantins	12 (0,5%)	14 (0,6%)	2.232
12 - Rondônia	09 (1,7%)	09 (1,7%)	541
Total	147 (0,65%)*	199 (0,88%)*	22.634

Na figura 9 são apresentados os resultados de 18 soros submetidos ao teste imunoenzimático *western blot* realizado com proteínas de *Treponema pallidum* cepa Nichols, cultivados em orquite de coelhos. Pode-se visualizar no soro 1, reagente, uma grande quantidade de proteínas presentes entre 15,5 kD e 80 kD. As amostras 2 e 3, correspondentes a soros não reagentes, apesar de mostrar reatividade contra algumas proteínas, não reagiram com proteínas de 17 kD e 15,5 kD. O comportamento dos outros 16 soros será analisado posteriormente.

Figura 9 – Reatividade de IgG obtida em 18 soros que apresentaram diferentes resultados nos testes não treponêmicos e treponêmicos, na reação de *western blot* com proteínas de *Treponema pallidum*.



Na tabela 8 é apresentada a caracterização sorológica dos 18 soros submetidos ao teste *western blot*. De acordo com essa caracterização, verifica-se que nas amostras 1, 6, 8, 10, 14, 16 e 17 o ELISA concorda com o resultado reagente do FTA-ABS, nas amostras 2, 3 e 12 o ELISA também concorda com o resultado negativo do FTA-ABS. Nas amostras 5, 7, 9, e 18 o ELISA apresenta resultados falso-negativos e finalmente nas amostras 4, 11, 13 e 15 o resultado do ELISA é repetidamente indeterminado.

A tabela 8 apresenta também o resultado do teste quanto à presença das proteínas de 43 kD, 17 kD e 15,5 kD nessas amostras, sendo classificadas em forte, fraca e ausente, de acordo com visualização direta.

Tabela 8 – Características das amostras submetidas ao teste *western blot* e presença das bandas de 43 kD, 17 kD e 15,5 kD.

Número	FTA-ABS	ELISA	VDRL	43 kD	17 kD	15,5 kD	Resultado do Western blot
1	Reagente	Reagente	1/64	Forte	Forte	Forte	Reagente
2	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Ausente	Ausente	Ausente	Não reagente
3	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Traços	Ausente	Ausente	Não reagente
4	Não reagente	Indeterminado	Não reagente	Fraca	Fraca	Fraca	Reagente
5	Reagente	Não Reagente	1/4	Traços	Ausente	Ausente	Não reagente
6	Reagente	Reagente	Não reagente	Fraca	Forte	Fraca	Reagente
7	Reagente	Não Reagente	1/2	Traços	Ausente	Ausente	Não reagente
8	Reagente	Reagente	Não reagente	Fraca	Forte	Fraca	Reagente
9	Reagente	Não Reagente	1/4	Ausente	Ausente	Ausente	Não reagente
10	Reagente	Reagente	1/1	Forte	Fraca	Forte	Reagente
11	Reagente	Indeterminado	Não reagente	Forte	Forte	Fraca	Reagente
12	Não reagente	Não reagente	Não reagente	Ausente	Ausente	Ausente	Não reagente
13	Não reagente	Indeterminado	Não reagente	Forte	Fraca	Fraca	Reagente
14	Reagente	Reagente	Não reagente	Fraca	Fraca	Fraca	Reagente
15	Reagente	Indeterminado	1/2	Forte	Forte	Forte	Reagente
16	Reagente	Reagente	Não reagente	Forte	Forte	Forte	Reagente
17	Reagente	Reagente	Não reagente	Forte	Forte	Forte	Reagente
18	Reagente	Não reagente	1/8	Ausente	Ausente	Ausente	Não reagente

DISCUSSÃO

5. Discussão

Um pouco diferente da proposta de outros trabalhos que avaliam a qualidade dos *kits*, o nosso estudo objetiva verificar o comportamento de um método treponêmico, especificamente um ELISA de competição, numa população de baixa prevalência para sífilis.

Para realizar o estudo foi empregada uma amostragem composta por 23.531 soros coletados de indivíduos de 18 anos que se alistaram no Exército Brasileiro, no ano de 1996, oriundos de todos os estados e em número estatisticamente calculado, para representar de maneira bastante real esta faixa de população de cada região. O alistamento militar é obrigatório e participam dele todos os jovens de 18 anos, moradores de áreas rurais ou de centros urbanos, pertencentes a todas as classes sociais e com diversos níveis de escolaridade, variando de analfabetos a alunos de cursos universitários. Por isso essa amostragem, tão heterogênea, pode ser considerada muito próxima ao perfil da nossa população jovem do sexo masculino.

Conforme constatamos, esta população é de baixa prevalência para sífilis e por isso ideal para conhecer o comportamento do método treponêmico imunoenzimático competitivo quanto à sua capacidade como teste de triagem. Excetuando-se alguns locais, como por exemplo Recife onde a positividade chega a 2%, a prevalência de sorologia positiva para sífilis nas unidades hemoterápicas brasileiras é de aproximadamente 1,8% (COSAH, 1998). A soro prevalência encontrada por nós situou-se abaixo deste percentual, sendo de 0,63% para o

VDRL e de 0,84% para o ELISA. A positividade do ELISA foi 33% maior do que a do VDRL, fato que será discutido mais adiante.

A triagem sorológica da sífilis é procedimento diário em muitos laboratórios de sorologia, seja para diagnóstico clínico, seja para seleção de sangue doado.

No Brasil a triagem para sífilis é feita com o teste não treponêmico de floculação VDRL e apenas os casos reagentes nesse teste são confirmados com testes treponêmicos, principalmente por FTA-ABS ou hemaglutinação indireta (TPHA). Os testes imunoenzimáticos treponêmicos vêm sendo utilizados gradativamente, principalmente para a detecção de IgM em casos suspeitos de sífilis congênita. Entretanto, este teste é ainda recente quanto a sua comercialização no mercado nacional e desta forma carece de conhecimentos quanto ao seu desempenho.

Segundo YOUNG (1998) e IJSSELMUIDEN (1989), nos países europeus a triagem sorológica para sífilis é baseada em métodos treponêmicos tais como a hemaglutinação indireta (TPHA) ou, os ensaios imunoenzimáticos, introduzidos no diagnóstico da sífilis por Veldkamp e Visser em 1975. Nos Estados Unidos, o método não treponêmico de floculação RPR é utilizado na triagem dos laboratórios clínicos, enquanto que a triagem com métodos treponêmicos está reservada aos bancos de sangue (YOUNG; 1998; LARSEN, 1998).

Durante muito tempo não se questionou os procedimentos adotados no nosso país para esta triagem. Atualmente existe uma preocupação quanto à eficiência da conduta adotada de testar inicialmente as amostras com um teste não treponêmico e só utilizar métodos treponêmicos para confirmação. Os motivos que vêm gerando esta preocupação podem ser representados por três fatos principais. Primeiro, a sífilis é a única doença que, em unidades hemoterápicas, é triada com um método inespecífico. Aparentemente o VDRL tem sido eficiente pois, é pequeno o número de casos de sífilis transfusional relatados. No entanto parece estar ocorrendo uma tendência de aumento no número de casos de sífilis latente, melhor diagnosticada por métodos treponêmicos (LARSEN, 1995; MAYER, 1996; AZULAY, 1998). Os casos de sífilis latente, não detectados por testes não treponêmicos, podem causar infecção pós transfusional especialmente,

quando são utilizados concentrados de plaquetas que não são armazenados em geladeira e normalmente são transfundidos antes de 3 dias. Quanto ao sangue, a possibilidade de infecção é tida como sendo remota pelo fato dos treponemas morrerem entre 48 e 72 horas a 4°C (DE SCHRYVER, 1990; SEIDL, 1990), porém, VAN DER SLUIS (1984) mostrou em trabalho experimental que esse período pode chegar a 120 horas dependendo da carga bacteriana presente na unidade de sangue. Além disso, mesmo que os treponemas morram durante a estocagem, a transfusão de uma carga antigênica extra, pode representar uma exigência adicional ao sistema imune de pacientes já comprometidos, como por exemplo os leucêmicos.

Segundo, existe um grande número de indivíduos coinfectados por HIV e *Treponema pallidum* e nesses casos a sífilis talvez seja melhor diagnosticada com método treponêmico (JOHNS, 1987, HICKS, 1987, HANDSFIELD, 1992, HASLETT, 1994, CDC, 1998 c).

Terceiro, a entrada no mercado de testes treponêmicos imunoenzimáticos possibilitou a agilização da triagem para sífilis por meio de testes específicos, visto que as outras reações sorológicas treponêmicas não são viáveis para triagem porque não podem ser aplicadas a grandes rotinas, como o FTA-ABS, ou porque não são suficientemente sensíveis na sífilis primária, como a hemaglutinação indireta.

Por outro lado, mesmo não havendo dados publicados, sabemos por comunicações verbais, que algumas unidades hemoterápicas que iniciaram a triagem treponêmica, estão alarmadas com o aumento no número de bolsas descartadas por sífilis, em relação ao que acontecia com a triagem por VDRL. Esse aumento no número de bolsas descartadas deve ser bem avaliado sendo necessário verificar as possíveis causas dos resultados sorológicos. Algumas já foram comentadas anteriormente quando nos referimos ao aumento de casos de sífilis latente ou simplesmente ao fato do método treponêmico se manter reagente mesmo após a negatificação do VDRL, em resposta ao tratamento.

Outro fato que deve ser considerado refere-se à qualidade da reação de VDRL. Esse teste é de simples execução, porém muitos laboratórios têm

dificuldades em manter a sua padronização, principalmente porque é bastante trabalhosa, sendo necessário despender muito tempo quando existe um grande número de amostras a cada dia. Além das características específicas do procedimento técnico do teste VDRL como o preparo correto da suspensão antigênica, tipo de placa, velocidade de rotação correta, temperatura ambiente e diluição do soro para prevenção do fenômeno de pró zona, existem problemas relacionados à qualidade dos *kits* disponíveis.

É grande o número de *kits* para VDRL disponíveis no mercado, no entanto, NUNES (1998), demonstrou que não existe padronização entre esses reagentes produzidos e comercializados ou apenas comercializados no Brasil. O pesquisador demonstrou, ao estudar treze *kits* de diferentes fabricantes nacionais e internacionais, não haver controle dos reagentes, verificando variações extremas no resultado de um mesmo soro quando testado com reagentes dos diferentes fabricantes. Uma mesma amostra, por exemplo, variou de não reagente a reagente até a diluição 1/32, tendo ainda evidenciado a variação de comportamento dos reagentes entre os diferentes lotes de um mesmo fabricante. Em síntese o autor, em um trabalho histórico na área de Controle de Qualidade de reagentes para laboratórios, constatou que os kits não treponêmicos, de diagnóstico de sífilis, comercializados no nosso país não têm as mesmas características quanto à capacidade do antígeno em detectar anticorpos, produzindo diferentes resultados e conseqüentemente levando a adoção de condutas clínicas erradas ou desnecessárias no contexto de “Combate e Controle” desta doença no Brasil.

Todos os fatos expostos somados à característica particular da sífilis de apresentar comportamento sorológico diverso, de acordo com o período em que foi instituído o tratamento, ou ainda na ausência de qualquer tratamento, contribuem para que a sorologia dessa doença seja de interpretação complexa, tornando difícil a escolha do “melhor” método para o diagnóstico sorológico (ver figuras 1, 2 e 3). Visando contribuir para a melhoria do diagnóstico sorológico, o nosso estudo realizou VDRL e ELISA treponêmico em 23.531 amostras provenientes de conscritos de todas as regiões brasileiras.

Inicialmente o *kit* imunoenzimático por nós adotado, foi testado frente ao painel “Syphilis Mixed Titer Performance Panel PSS201”, da BBI, composto de 25 amostras com resultados conhecidos. O *kit* imunoenzimático competitivo demonstrou ser de boa qualidade, pois os resultados apresentados, nos dois lotes testados, concordaram em 100% com a caracterização do painel (Tabela 2), composto por amostras bem definidas como verdadeiro positivo (23) e verdadeiro negativo (2).

O comportamento do teste imunoenzimático, na população deste estudo, foi analisado com base nos resultados do FTA-ABS, considerado como teste de referência ou padrão ouro.

A comparação com o teste não treponêmico VDRL foi inevitável por ser este o utilizado de norte a sul do país na triagem das amostras, tanto em laboratórios clínicos como em serviços que fazem triagem sorológica do sangue doado, por ser simples e de baixo custo e, ainda por ser análogo ao RPR, método de triagem utilizado em laboratórios clínicos, nos EUA. O comportamento do VDRL também foi comparado com os resultados do teste de referência, objetivando estabelecer critérios para uma análise crítica na decisão e escolha de um método adequado para triagem sorológica, segundo a realidade brasileira.

Comparando com o teste de referência FTA-ABS, a sensibilidade que determinamos para o ELISA foi de 89,95% com intervalo de confiança ao nível de 95% (IC) de 85,3% a 93,3%, correspondendo a 10% (22/219) de falso negativos, enquanto o VDRL apresentou sensibilidade de 55,11%, com 44,89% (101/225) de falso negativos. A baixa sensibilidade do teste de VDRL já era esperada pelo fato do teste de referência ser treponêmico, o qual permanecerá sempre positivo, mesmo na vigência de uma negativação do VDRL e no caso da sífilis latente. Por outro lado, os resultados positivos na sorologia treponêmica podem apenas estar refletindo cicatrizes sorológicas, estando o VDRL negativo nesses casos. Por essas características o teste VDRL tem sido utilizado como recurso diagnóstico mais preciso da atividade da doença (REISNER, 1997).

SILLETTI (1995) relata ter encontrado sensibilidade de 82% no ELISA quando comparado com FTA-ABS em pacientes com sífilis primária, todavia

YOUNG (1989) e EBEL (1998) relatam perda de sensibilidade do mesmo teste no período de latência, bem como no soro de indivíduos submetidos a tratamento. Em relação à sensibilidade encontrada em nosso estudo para o teste imunoenzimático, devemos considerar que não conhecemos a história clínica dessa população e que a sorologia desses conscritos, nascidos entre 1978 e 1979, pode estar refletindo em muitos casos a sífilis congênita latente. Essa possibilidade deve ser considerada, pois até hoje muitas mulheres não fazem nenhum acompanhamento clínico e sorológico pré natal. A falta do exame pré natal pode refletir no nascimento de crianças portadoras de doenças congênitas entre elas a sífilis. Ademais acredita-se que em 1978 o número de mulheres brasileiras que faziam acompanhamento pré natal era menor do que atualmente. Felizmente nos últimos anos, houve melhora quanto à informação a respeito da importância do exame pré natal, apesar do nosso sistema de saúde não ter sofrido grandes mudanças, em nível nacional.

A especificidade que determinamos para o ELISA foi de 99,8% (IC 99,2% - 99,9%), com 0,18% (2/890) de falso positivos, enquanto a especificidade do VDRL foi de 97,4%, com 2,0% (23/895) de falso positivos. Este comportamento do VDRL era esperado por tratar-se de uma reação de determinação indireta, que pesquisa no soro do paciente reaginas, que são um conjunto de anticorpos das classes G e M com características lipofílicas específicas, produzidos contra componentes da membrana externa do *Treponema pallidum*. Estes anticorpos são ainda produzidos como resposta a uma lesão tecidual sendo, portanto, passíveis de serem encontrados em outras doenças ou até mesmo em condições fisiológicas (LARSEN, 1995; SINGH, 1999).

O ELISA apresentou ainda 11 soros com resultados persistentemente inconclusivos, dos quais 7 foram reagentes no FTA-ABS e 4 não reagentes no mesmo teste. Apesar de serem sorologias com antígenos treponêmicos, esta discordância com os soros cujos resultados se situam na região muito próxima ao limiar de reatividade é natural, devido às características do critério de interpretação dos testes imunoenzimáticos de um modo geral. Os soros com resultados inconclusivos foram excluídos dos nossos cálculos de sensibilidade e

especificidade. Esse critério foi diferente do adotado por YOUNG (1998) que considerou os resultados inconclusivos como reagentes.

A sensibilidade por nós obtida no teste competitivo foi menor do que aquelas encontradas por DE MAJO (1995) e EBEL (1998) para o método competitivo, 99,6% (IC 97,9 – 99,9) e 99,5% (IC 98,3 – 99,9) respectivamente, sendo mesmo assim muito superior aos resultados de VDRL, confirmando o comportamento típico dos testes treponêmicos.

Na população por nós estudada, o teste VDRL deixou de apresentar reatividade em 101 soros, reforçando sua melhor eficácia no diagnóstico de doença ativa. Esses 101 soros reativos nos testes treponêmicos podem refletir sífilis tratada precocemente, sífilis congênita latente ou ainda fase de soro conversão da sífilis primária.

Em contrapartida, um grupo menor de 22 soros, entre os quais 14 reagentes nos testes VDRL e FTA-ABS, considerados verdadeiro positivos, não foi detectado pelo teste enzimático. Nestes casos a sensibilidade do VDRL parece ter sido superior a do teste imunoenzimático.

DE MAJO (1995) estudou comparativamente o método treponêmico imunoenzimático competitivo e o método de hemaglutinação. Na sua amostragem de 2.354 soros, encontrou 1 resultado falso negativo nos dois testes. Justificou o resultado do ELISA a uma possível ligação pouco específica com o conjugado. A sensibilidade determinada com essa metodologia foi de 99,6% (IC 97,9% a 99,9%) e a especificidade também de 99,6% (IC 99,2% a 99,8%). O autor, no entanto, não relata ter utilizado um teste de referência para calcular a sensibilidade e a especificidade, o que foi feito com a simples comparação das duas metodologias estudadas.

EBEL (1998) relata que testando 434 soros de pacientes em diversos estágios da sífilis, obteve 2 resultados não reagentes no ELISA competitivo com duas amostras que apresentaram resultados fracamente reagentes no FTA-ABS e no TPHA. Segundo o autor, esse tipo de resultado é sugestivo de pacientes tratados previamente. Este autor relata ainda que os testes imunoenzimáticos têm

sensibilidade similar ao FTA-ABS e ao TPHA, em todos os estágios da sífilis, com exceção da sífilis primária, período em que o teste tem baixa sensibilidade.

Os achados em nosso estudo, embora tenham apresentado medidas estatísticas diferentes, são concordantes com os achados de EBEL e colaboradores (1998), mostrando uma tendência comportamental mais voltada a produção de resultados falso negativos.

YOUNG (1989) considera que o resultado não reagente do ELISA com FTA-ABS e TPHA reagentes, no soro de uma paciente com sífilis latente, foi reflexo do tratamento prévio dessa paciente. YOUNG discute seu resultado de 98,4% (IC 97,6% - 99,0%) de sensibilidade no *kit* imunoenzimático treponêmico para pesquisa de anticorpos IgG, em que apenas 41% das amostras eram reagentes no teste VDRL (25/61) comparando com os resultados concordantes entre o VDRL e ELISA obtidos por BOROBIO (1985), STEVENS (1985) e MOYER (1987) que obtiveram também com testes ELISA treponêmicos, sensibilidades de 75% (IC 63,9% - 83,6%), 99,5% (IC 97,4% - 99,9%) e 95% (IC 91,1% - 97,3%), respectivamente, quando estudaram soros de 42, 218 e 202 pacientes com sífilis. YOUNG considerou que as diferenças na sensibilidade são devidas às características sorológicas das amostras. A sensibilidade de 75% foi obtida com amostras que apresentaram apenas 72,4% de reatividade no VDRL, 99,5% quando todas as amostras foram reagentes no teste VDRL e 95% quando 94% das amostras foram reagentes no VDRL. Assim como Young, nós achamos que a sensibilidade do teste depende das características sorológicas das amostras e portanto da procedência, ou seja, se pertencem a populações de alta ou baixa prevalência.

Considerando o intervalo de confiança, nossos resultados são comparáveis com os 95% obtidos por MOYER. Ao estudar o *kit* treponêmico imunoenzimático Bio-EnzaBead, o autor encontrou 10,5% de resultados falso negativos. Esse percentual foi verificado no grupo de amostras obtidas de pacientes com sífilis latente tardia. Nosso estudo também encontrou um percentual de 10% de resultados falso negativos porém, diferente das amostras de MOYER (1987) não conhecemos os dados clínicos dos conscritos.

A especificidade encontrada para o teste ELISA competitivo foi de 99,8% (IC 99,2% a 99,9%) valor este que concorda com os 99,3% (IC 98,6% a 99,6%) obtidos por YOUNG (1989), 99,6% (IC 99,2% a 99,8%) obtidos por DE MAJO (1996) e 99,4%(IC 98,0% a 99,8%) obtidos por EBEL (1998), apesar das diferenças epidemiológicas existentes nas populações estudadas, entre países comprovadamente desenvolvidos e os ditos em desenvolvimento.

A avaliação dos dados referentes à sensibilidade e especificidade do teste ELISA competitivo e do VDRL, mostra melhor desempenho do primeiro teste na triagem. No entanto, considerou-se necessário investigar o perfil das amostras que apresentaram resultados falsos. Para isso, comparou-se o comportamento do ELISA com os diversos resultados obtidos no VDRL e FTA-ABS.

Conforme demonstrado na tabela 3, dos 124 soros verdadeiro positivos (reagentes nos teste VDRL e FTA-ABS), 14 apresentaram resultados não reagentes no ELISA e 5 apresentaram resultados inconclusivos, correspondendo a 11,3% (14/124) de resultados falso negativos e 3,57% (5/124) de inconclusivos.

Na tabela 4 podemos observar que o teste enzimático concordou em 100% com o resultado do FTA-ABS nos 22 soros com VDRL falso positivos. Em contrapartida, conforme resultados da tabela 5, houve concordância de 91% dos resultados do teste enzimático em amostras cujo resultado do FTA-ABS foi reagente e o resultado do VDRL foi não reagente, apresentando ainda 7 soros (7,14%) falso negativos e 2 soros (2,04%) inconclusivos. As diferenças de resultados entre os dois testes treponêmicos podem estar relacionadas à composição dos antígenos envolvidos nas reações. Como mostraremos mais adiante, o ELISA competitivo detecta anticorpos contra antígenos de 43, 17 e 15,5 kD. Já o FTA-ABS detecta anticorpos contra antígenos de membrana.

Como não conhecemos os dados clínicos da população deste estudo e por isso questionamos a possibilidade, já mencionada em outros estudos, de que o ELISA possa deixar de ser reagente em sífilis tratada (cicatriz), possa ser incapaz de detectar precocidade sorológica, ou ainda que possa ser ineficaz no diagnóstico da sífilis latente. Talvez isso justifique o fato do ELISA ter apresentado

4 soros (0,46%) com resultado falso positivo e 2 inconclusivos (0,23%) nas 872 amostras com VDRL e FTA-ABS não reagente (tabela 6).

A distribuição dos títulos de VDRL variou da diluição 1/1 a 1/256 nos 124 soros verdadeiro positivos (figura 6). A maior concentração de amostras está entre os títulos 4 e 16, compreendendo 58% dos soros e entre 2 e 32 correspondendo a 90% dos soros. A distribuição dos 14 soros com resultado não reagente no ELISA está dentro da faixa de 90% com 10 soros (tabela 3) e apenas 4 soros fora dessa faixa. Nenhum soro, no entanto foi não reagente no ELISA quando no VDRL o título foi superior a 8, demonstrando que os títulos superiores a 8 tem maior valor preditivo positivo.

A figura 7 foi construída com o objetivo de verificar se há correlação entre o título de VDRL e a relação DO/LR do teste ELISA. Parecia existir uma tendência das relações estarem situadas mais próxima de zero quanto maior fosse o título, no entanto quando analisamos as relações DO/LR de diversas amostras reagentes no ELISA e não reagentes no teste VDRL, verificamos que sua distribuição ocorre tanto em valores mais próximos de um quanto em valores mais próximos de zero, não permitindo dessa forma que se estabelecesse qualquer relação entre os dois resultados.

A concordância entre os testes utilizados está apresentada na figura 8, sendo que do total de 1120 amostras testadas com FTA, VDRL e ELISA, 15 foram excluídas e as outras 1105 foram distribuídas na figura de acordo com os seus resultados. Oitenta e oito por cento (972/1105) apresentaram o mesmo resultado nos três testes destes, 78,5% não reagentes e 9,5% reagentes. Oito vírgula três por cento (92/1105) apresentaram resultados concordantes apenas nos testes treponêmicos, com VDRL não reagente podendo refletir, conforme já discutido, cicatriz sorológica ou sífilis primária em fase de soro conversão. Dois vírgula um por cento (23/1105) apresentaram testes treponêmicos não reagentes com VDRL falso positivo. Do total, apenas 1,6% apresentaram resultados inesperados por não haver concordância dos resultados dos testes treponêmicos, fato que como já mencionamos, pode estar relacionado ao tipo de antígenos empregados nos dois

testes ou ainda a possibilidade do ELISA apresentar comportamento diferente do FTA, não permanecendo reagente após o tratamento.

Quando separamos os resultados por Região Militar verificamos que há grande variação percentual de reatividade dos testes nos diversos Estados (Tabela 7). Minas Gerais, por exemplo, não apresentou nenhuma amostra reagente no teste VDRL e 0,5% de reatividade no ELISA, mostrando ser um estado com baixa prevalência da doença. De acordo com informações que obtivemos junto à Diretoria do Hemocentro de Minas Gerais (HEMOMINAS), a reatividade encontrada na triagem de sangue para sífilis é de 0,28% para o teste VDRL e de 1,55% para o ELISA.

Excetuando-se Minas Gerais, se verificarmos nossos dados, observamos que São Paulo apresentou a menor reatividade com 0,2% (IC 0,1% - 0,4%) no teste VDRL enquanto Rondônia apresentou 1,7% (IC 0,9% - 3,1%). Esses achados parecem confirmar pelo menos em parte as informações de que a sífilis está relacionada a condições econômicas e sociais menos favorecidas (BENENSON, 1997). Mesmo sabendo-se que o consumo de drogas, considerado fator importante na propagação da doença devido à troca de sexo por drogas, é grande em regiões metropolitanas, acreditamos que o nível educacional na Região Norte é menor e portanto não só o acesso às informações como também a compreensão das informações recebidas é menor.

A Coordenação Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde (COSEH) apresenta no Relatório de Atividade de 1998, os índices regionais de positividade nos testes sorológicos realizados na seleção de doadores de sangue. Os percentuais de reatividade para sífilis só são menores do que os encontrados para as hepatites, mostrando claramente que a infecção pelo *T. pallidum* deve continuar sendo monitorada com muito cuidado porque está presente na população. De acordo com o relatório, a positividade do VDRL é a seguinte: Região Norte 2%, Nordeste 1,82%, Centro-Oeste 1,91%, Sudeste 1,39% e Sul 0,58%. Apenas as Regiões Nordeste e Sudeste relatam resultados do ELISA treponêmico com 2,20% e 2,11% de positividade respectivamente. Se analisarmos nossos dados por região do país, verificamos índices menores, com a Região

Norte (1,45%) apresentando a maior positividade seguida da Região Sudeste (0,81%), Nordeste (0,67%), Sul (0,55%) e Centro-Oeste (0,48%). Na nossa amostragem não estão contemplados todos os Estados, por exemplo, faltam os Estados do Amazonas e Roraima, além disso a Região Militar 12 é composta pelo Estado de Goiás, pertencente à Região Centro-Oeste e pelo Estado do Tocantins, pertencente à Região Norte. Provavelmente as diferenças percentuais por nós encontradas devem-se mais às características da nossa amostragem, que é constituída apenas por indivíduos do sexo masculino com 18 anos, e pode refletir as diferenças culturais de cada região como por exemplo maior consumo de drogas nessa faixa etária ou o início da atividade sexual.

É sabido que os testes do tipo ELISA costumam apresentar um maior número de resultados falso positivos porém, o fato do teste em estudo ter apresentado alguns resultados falso negativos fez com que nos interessássemos por essas amostras com objetivo de tentar compreender se o seu comportamento. As hipóteses que gostaríamos de analisar eram: se esses resultados são decorrentes do mecanismo de ação da metodologia, se esses soros possuíam anticorpos contra outras proteínas de *T. pallidum* que não as habituais ou ainda se esses resultados negativos poderiam corresponder a amostras realmente negativas mas que permanecem reagentes nos testes VDRL e FTA-ABS, correspondendo ao perfil sorológico de indivíduo tratado tardiamente. Para tentar elucidar as discordâncias existentes entre os resultados, realizamos um teste imunoenzimático do tipo *western blot* com proteínas do *T. pallidum* (Figura 9).

Inicialmente tivemos dúvidas se deveríamos utilizar o método de *western blot*, por isso realizamos um estudo preliminar com o antígeno liofilizado comercial, utilizado para FTA-ABS. Executamos algumas corridas eletroforéticas e eletrotransferências para nitrocelulose. Nas fitas preparadas com esse antígeno, quando coradas com Ponceau S, verificamos a presença de uma banda muito larga, na altura da proteína de 60 kD, provavelmente composta por albumina. As reações com anticorpo no entanto, mostraram boa distinção entre os soros positivos, com presença de bandas bem diferenciadas e o soro negativo, que não apresentou bandas detectáveis. A presença de albumina na corrida, parece não

ter interferido. A reação se mostrou boa e útil para o estudo porém, o pequeno número de proteínas separadas nos fez concluir que deveríamos utilizar antígeno “bruto”, extraído de orquite de coelho, visto que todas as referências consultadas indicavam a presença de um grande número de proteínas.

Para a reação de *western blot* com antígeno “bruto” de *Treponema pallidum*, procuramos selecionar amostras com comportamento distinto, e assim utilizamos soros reagentes e não reagentes no VDRL, no FTA-ABS e no ELISA e soros com resultados divergentes nestes três testes. LUCKEHART (1986), mostrou em estudos com sífilis experimental que a técnica de *western blot* detectava principalmente proteínas de membrana de 47, 17 e 15 kD e as proteínas de endoflagelo de 37 e 33 kD. Conforme CHAMBERLAIN (1988) e RADOLF (1998), o resultado de um *western blot* para sífilis é considerado positivo se a amostra apresentar anticorpos contra as proteínas de 47 kD, 45 kD, 17 kD e 15,5 kD de *T. pallidum*. O Manual de Sífilis, em sua última edição (LARSEN, 1998) apresenta a técnica de *western blot*, destacando a importância de anticorpos contra proteínas de 47, 17 e 15,5 kD, com especial destaque para a proteína de 17 kD que é considerada específica para a doença. Nosso estudo por *Western blot* é apenas preliminar visto que foi testados apenas um pequeno número de amostras. O teste que realizamos permitiu a avaliação de anticorpos contra proteínas que migraram na faixa dos 43 kD, 17 kD e 15,5 kD, conforme apresentado na tabela 8. As diferentes condições das corridas eletroforéticas admitem variações de até 10% na massa molecular determinada. Na nossa avaliação, as bandas que migraram na região de 43 kD podem corresponder à proteínas de 46 a 48 kD. O comportamento dos soros que testamos, com relação aos anticorpos contra essas proteínas mostrou que nos soros com ELISA não reagentes não houve reatividade contra as proteínas de 17 e 15,5 kD e que na faixa de 43 kD, quatro soros não apresentaram anticorpos contra essas proteínas e outros três apresentaram apenas traços. Na maioria das vezes os soros com resultados inconclusivos mostraram reatividade fraca contra a proteína de 15,5 kD. Observamos ainda, que a presença de anticorpos contra as proteínas na faixa de

43 kD acompanha a presença de anticorpos contra as proteínas de 17 e 15,5 kD, conforme apresentado na tabela 8.

Os soros 5, 7, 9 e 18 que se apresentam não reagentes no *Western blot* e no ELISA, com resultados reagentes nos testes FTA-ABS e VDRL parecem confirmar a hipótese de que o ELISA negativa após tratamento, caracterizando essas amostras como cicatriz sorológica.

O resultado do *Western blot* sugere que as principais proteínas que participam do teste ELISA competitivo são as proteínas de 15,5 kD, 17 kD e 43 kD (46 a 48kD).

Estudos adicionais e melhor padronização do método poderão responder nossas dúvidas e confirmar os achados de autores que propõem o uso da técnica de *western blot* em substituição ao FTA-ABS, por ser um método extremamente objetivo, sensível e específico (BYRNE, 1992, MEYER, 1994). HENSEL e col. (1985) determinaram que sua sensibilidade varia de 93,8% a 98,5% e sua especificidade é de 100%.

Além do estudo de desempenho das metodologias para triagem, deve-se avaliar também o custo financeiro das técnicas. Um teste ELISA para sífilis custa atualmente em torno de R\$ 2,5 (dois reais e cinquenta centavos) enquanto o teste VDRL custa aproximadamente R\$ 0,40 (quarenta centavos de Real), considerando-se a triagem com soro puro e mais uma diluição. REISNER (1997), ao avaliar a triagem com ELISA seguida da execução de RPR nas amostras reagentes, determinou alguns custos levando em consideração também o tempo de execução dos testes.

É muito difícil estabelecer o tempo necessário para a execução, por exemplo, de 100 testes de VDRL. Essa metodologia exige inativação dos soros (30 minutos), diluição de cada soro que é testado inicialmente puro e com uma diluição (teste qualitativo). Além disso, as amostras reagentes no teste qualitativo devem ser diluídas para determinar o título. Nossa experiência pessoal mostrou que para testar 500 amostras por VDRL são necessárias 5 pessoas, em um turno de 8 horas de trabalho. O preço da mão de obra no Brasil ainda é barato por isso, restringimos a análise dos custos unicamente ao preço dos reagentes.

A análise do componente econômico nas atividades laboratoriais deve considerar entre outras coisas a relação custo/benefício que a introdução ou substituição de metodologias trará ao laboratório. Entre os benefícios a agilidade na emissão de resultados, a melhora da capacidade diagnóstica e a garantia da qualidade do resultado devem ser considerados. A garantia da qualidade deve levar em conta os benefícios que um método mais sensível pode trazer principalmente para identificar e prevenir doenças congênitas como a sífilis. O tratamento da sífilis durante a gravidez é muito eficiente e barato, representando economia importante para o sistema público de saúde, porque os custos de tratamento, internação e acompanhamento de crianças com sífilis congênita são elevados.

O teste VDRL parece ser ainda o método de escolha quando se trata de amostras clínicas com suspeita de infecção. No entanto na triagem de amostras de populações, como das unidades hemoterápicas, devem considerar a associação das duas metodologias, porque em nosso estudo, verificamos que estão detectando reatividade em diferentes indivíduos.

A agilidade dos serviços seria grandemente aumentada se fosse possível fazer a triagem com a metodologia imunoenzimática, reservando o VDRL para os soros reagentes que devem ser titulados, pois a variação no título do soro é indicadora da resposta ao tratamento. No entanto é necessário que novos estudos sejam realizados para determinar realmente a participação das proteínas no ELISA e para determinar também se é real a observação de que ocorre negatização do teste após tratamento e qual sua sensibilidade no diagnóstico da sífilis primária.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES

1. O teste imunoenzimático detectou anticorpos em indivíduos diferentes daqueles detectados pelo teste não treponêmico VDRL, sugerindo a importância em associar a triagem treponêmica imunoenzimática com a já tradicional triagem não treponêmica, principalmente em serviços de baixa prevalência e na triagem sorológica de gestantes;
2. As principais proteínas que se ligam a placa de poliestireno parecem ser as lipoproteínas de 43 kD, 17 kD e 15,5 kD.

7. PERSPECTIVAS

1. Estabelecer curva de desempenho do ELISA em amostras bem caracterizadas de sífilis primária e secundária tratadas e não tratadas e nas diversas formas de latência;
2. Determinar precisamente quais são as proteínas que predominantemente se ligam às placas de poliestireno, no ELISA;
3. Determinar a importância das proteínas de 43 kD 17 kD e 15,5 kD na resposta imune dos indivíduos.

RESUMO

8. Resumo

Foram testadas, com o teste não treponêmico VDRL e com o teste treponêmico imunoenzimático de competição, 23.531 amostras de soros, coletados em todas as regiões do Brasil, com o objetivo de verificar o comportamento do teste imunoenzimático treponêmico na triagem de amostras. A prevalência obtida foi de 0,63% com o VDRL e de 0,84% para o teste imunoenzimático. A análise dos dados foi feita comparando-se os resultados dos dois testes com os resultados do teste treponêmico de imunofluorescência indireta (FTA-ABS), considerado como teste de referência. No total, 1120 amostras foram submetidas ao teste FTA-ABS, incluindo todas as que foram reagentes em qualquer um dos testes de triagem e 872 amostras negativas. Amostras com resultados discordantes entre os testes foram submetidas a um teste imunoenzimático do tipo *Western blot*. Nas amostras por nós estudadas, o teste imunoenzimático apresentou sensibilidade de 89,95% e especificidade de 99,78%, muito superior aos 55,11% de sensibilidade e 97,43% de especificidade que encontramos para o VDRL. Os resultados dos testes detectaram positividade em amostras diferentes portanto, recomendamos utilizar a associação dos dois testes, como método de triagem, quando se trata de populações de baixa prevalência. Resultados preliminares do *Western blot* sugerem a participação das proteínas de 43 kD, 17 kD e 15,5 kD na reação de ELISA treponêmico competitivo.

ABSTRACT

9. Abstract

The VDRL, a non treponemal test, and a treponemal competitive ELISA were used to test 23,531 serum samples, collected from conscript men throughout Brazil, with the objective of assessing the performance of the competitive ELISA on the screening of serum samples. The VDRL showed a prevalence of 0.63% contrasting with a 0.84% prevalence showed by the competitive ELISA. The results obtained with the two tests were then compared to those obtained by fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-ABS) test which is considered the gold standard method for detection of antibodies for syphilis. A total number of 1,120 samples, which included all that were reagent in at least one of the screening test plus 872 that were negative in both tests, were submitted to the FTA_ABS test. In addition, some of the samples that presented discrepant results between the two tests studied were also submitted to the Western blot test. The results of the screening tests showed an 89.95% sensitivity and a 99.78% specificity for the competitive ELISA, which are much higher than the 55.11% sensitivity and 97.43% specificity presented by the VDRL. Also, the tests detected positivity in different samples. In conclusion, we recommended the use in tandem of both tests as screening for syphilis antibodies in low prevalence populations. In addition, the results of the Western blot seemed to suggest the positivity of the ELISA becoming non reactive after treatment of the patient and that the 43 kD, 17 kD and 15 kD proteins are the main proteins involved in the ELISA competitive reaction.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

- AKINS, D.R., PURCELL, B.K., MITRA, M.M., NORGDARD, M.V., RADOLF, J.D. Lipid Modification of the 17-kilodalton Membrane Immunogen of *Treponema pallidum* Determines Macrophage Activation as well as Amphiphilicity. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, n.4, p.1202-1210, 1993.
- AZULAY, D.R. & AZUALY, M.M. Doenças Sexualmente Transmissíveis. In: SHECHTER, M. & MARANGONI, D. V. **Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2^a ed., 1998. p.467-472.
- BAKER-ZANDER, S.A., SHAFFER, J.M., LUKEHART, S.A. Antibodies Enhance Phagocytosis of *Treponema pallidum* by Macrophages. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.67, p.1100-1105, 1993.
- BAKER-ZANDER, S.A., HOOK III, E.W., BONIN, P., HANDSFIELD, H.H., LUKEHART, S A. Antigens of *Treponema pallidum* Recognized by IgG and IgM Antibodies During Syphilis in Humans. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.151, n.2, p. 264-272, 1985.
- BAUGHN, R.E. Congenital Syphilis: Immunologic Challenges. **Pathol. Immunopathol. Research**, Basel, v.8, p.161-178, 1989.

- BAUGHN, R E., DEMECS, M., TABER, L.H., MUSHER, D.M. Epitop Mapping of B-Cell Determinants on the 15-kilodalton Lipoprotein of *Treponema pallidum* (Tpp15) with Synthetic Peptides. **Infect. Immun.**, Washington, v.64, n.7, p.2457-2466, 1996.
- BELDA, W. Sífilis. In: VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983, p.972-981.
- BELDA JR., W., NAUD, P., BECKER JR., FLICHMAN, J.C. Sífilis, Sífilis Congênita e Diagnóstico Laboratorial. In: NAUD PAULO e Colaboradores. **Doenças Sexualmente Transmissíveis & AIDS**. Porto Alegre, Artes Médicas, 1993, p.57-78.
- BELISLE, J.T., BRANDT, M.E., RADOLF, J.D., NORGDARD, M.V. Fatty Acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* Lipoproteins. **J. Bacteriol.**, Washington, v.176, n.8, p.2151-2157, 1994.
- BENENSON, A.S. **Manual para el control de las enfermedades transmisibles**. BENENSON A. S. Ed., 16^a ed, Washington, DC, OPS, 1997, p.416-421.
- BLANCO, D.R., MILLER, J.N., HANFF, P.A. Humoral Immunity in Experimental Syphilis: The Demonstration of IgG as a Treponemicidal Factor in Immune Rabbit Serum. **J. Immunol.**, Baltimore, v.133, n.5, p.2693-2697, 1984.
- BLANCO, D.R., REIMANN, K., SKARE, J., CHAMPION, C.I., FOLEY, D., EXNER, M.M., HANCOCK, R.E.W., MILLER, J.N., LOVETT, M.A. Isolation of the Outer Membranes from *Treponema pallidum* and *Treponema vincentii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.179, n.19, p. 6088-6099, 1994.
- BLANCO, D.R., CHAMPION, C.I., EXNER, M.M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., HANCOCK, R.E.W., TEMPST, P., MILLER, J.N., LOVETT, M.A. Porin Activity and Sequence Analysis of a 31-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum* Rare Outer Membrane Protein (Tromp1). **J. Bacteriol.**, Washington, v.177, n.12, p.3556-3562, 1995.
- BROMBERG, K., RAWSTRON, S. TANNIS, G. Diagnosis of Congenital Syphilis by Combining *Treponema pallidum*-Specific IgM Detection with Immunofluorescent Antigen Detection for *T. pallidum*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.168 p.238-242, 1993.

- BYRNE, R.E., LASKA, 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. Microbiol.**, Washington, v.30, n.1,
p.115-122, 1992.
- CAMARGO, M.E. A sífilis avança: Progride o diagnóstico? **Rev. Ass. Med. Brasil**,
São Paulo, v.34, n.1, p.19-23, 1988.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Epidemic Early
Syphilis - Montgomery County, Alabama, 1990-1991. **Morbid. Mortal. Wkly.
Rep.**, Atlanta, v.41, n.42, p.790-794, 1992.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Syphilis Screenig
Among Women Arrestees at the Cook Count Jail - Chicago, 1996. **Morbid.
Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.47, n. 21, p.432-433, 1998.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Primary and
Secondary Syphilis - United States, 1997. **Morbid. Mortal. Wkly. Rep.**,
Atlanta, v.47, n.24, p.493-497, 1998a.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Epidemic of
Congenital Syphilis - Baltimore, 1996-1997. **Morbid. Mortal. Wkly. Rep.**,
Atlanta, v.47, n.42, p.905-907, 1998b.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 1998 Guidelines
for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. **Morbid. Mortal. Wkly. Rep.**,
Atlanta, v.47, n.RR1, p.28-49, 1998c.
- CENTURION-LARA, A., CASTRO, C., SHAFFER, J.M., VAN VOORHIS, W.C.,
MARRA, C.M., LUKEHART, S.A. Detection of *Treponema pallidum* by a
sensitive reverse transcriptase PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35,
n.6, p.1348-1352, 1997.
- CHAMBERLAIN, N.R., BRANDT, M.E., ERWIN, A.L., RADOLF, J.D., NORGDARD,
M.V.. Major Integral Membrane Protein Immunogens of *Treponema pallidum*
Are Proteolipids. *Infect. Immun.*, Washington, v.57, n.9, p.2872-2877, 1989.

- CLARK, E.G, DANBOLT, N. The Oslo Study of the Natural Course of Untreated Syphilis: An Epidemiologic Investigation Based on a Re-study of the Boeck-Bruusgaard Material. **Med. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.48, n.3, p.613-623, 1964.
- COHEN, D.A., SCRIBNER, R., CORY, D. Controlling a Syphilis Epidemic. **West. J. Med.**, San Francisco, v.157, n.4, p. 430-432, 1992.
- COLLART, P., BOREL, L.J., DUREL, P. Étude de L'Action de La Pénicilline Dans La Syphilis Tardive: Persistence Du Tréponème Pale Après Traitement. **Annales de L'Institute Pauster**, Paris, p. 596-615, 1962.
- COORDENAÇÃO nacional de doenças sexualmente transmissíveis e Aids/MS (CNDST e Aids). **Conhecimento sobre os meios de transmissão da Aids: Uma avaliação com Conscritos do Exército. Brasil, 1996.** Brasília, 1998a.
- COORDENAÇÃO nacional de doenças sexualmente transmissíveis e Aids/MS (CNDST e Aids). **Boletim Epidemiol. DST.** Brasília, ano III, n.5, p.4-14, 1997.
- COORDENAÇÃO nacional de doenças sexualmente transmissíveis e Aids/MS (CNDST e Aids). **Boletim Epidemiol. DST.** Brasília, ano IV, n.2, p.4-23, 1998b.
- COORDENAÇÃO nacional de doenças sexualmente transmissíveis e Aids/MS (CNDST e Aids). **Relatório da Primeira Avaliação Externa da Qualidade dos Testes Sorológicos para Sífilis-AEQ-1/SIF, em 194 Instituições Públicas.** Brasília, 1999.
- COORDENAÇÃO DE SANGUE E HEMODERIVADOS (COSAH). **Relatório das Atividades da COSAH de 1998.** Brasília, 1998.
- COSTELLO, P. B.; POWELL, G. L.; GREEN, F.A. The Structural Requirements for Anti-cardiolipin Antibody Binding in Sera from Patients with Syphilis and SLE. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, New York, v.56, n.3, p.393-400, 1990.
- COX, D.L., CHANG, P., McDOWALL, A.W., RADOLF, J. The Outer Membrane, Not a Coat of Host Proteins, Limits Antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, n.3, p.1076-1083, 1992.

- DE MAJO, E., BIANCHINI, G., PARRI, F., TOCCI, E., MONACI, M., PAOLI, C. Evaluation of a Competitive Enzyme Immunoassay in Screening for Syphilis. **Microbiologica**, Pavia, v.19, p.31-38, 1996.
- DE SCHRYVER, A., MEHEUS, A. Syphilis and blood transfusion: a global perspective. **Transfusion**, Bethesda, v.30, n.9, p.844-847, 1990.
- EBEL, A., BACHELART, L., ALONSO, J.M. Evaluation of a New Competitive Immunoassay (BioElisa Syphilis) for Screening for *Treponema pallidum* Antibodies at Various Stages of Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.2, p.358-361, 1998.
- EGGLESTONE, S. Serologic Tests for Syphilis. **Lab - Medica Internat.**, Connecticut, p.16-17, july/august 1996.
- EGGLESTONE, S. Laboratory Diagnosis of Treponemal Infections. In: **Oficina de Trabalho Britânico-Brasileira Para Garantia da Qualidade dos Testes Laboratoriais de DST/AIDS**, Brasília, 1997.
- ENGELKENS, H.J.H., JUDANARSO, J., ORANJE, A.P., VUZEVSKI, V.D., NIEMEL, P.L.A., VAN DER SLUIS, J.J., STOLZ, E. Endemic Treponematoses. Part I. Yaws. **Internat. J. Dermatol.**, Philadelphia, v.30, n.2, p.77-83, 1991.
- FIELDSTEEL, A.H., COX, D.L., MOECKLI, R.A. Cultivation of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture. **Infect. Immun.**, Washington, v.32, n.2, p.908-915, 1981.
- FIELDSTEEL, A.H., COX, D.L., MOECKLI, R.A. Further Studies on Replication of Virulent *Treponema pallidum* in Tissue Cultures of Sf1Ep Cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.35, n.2, p.449-455, 1982.
- FITZGERALD, T.J., JOHNSON, R.C., MILLER, J.N., SYKES, J.A. Characterization of the Attachment of *Treponema pallidum* (Nichols Strain) to Cultured Mammalian Cells and the Potencial Relationship of Attachment to Pathogenicity. **Infect. Immun.**, Washington, v.18, n.2, p.467-478, 1977.
- FITZGERALD, T. J. Pathogenesis and Immunology of *Treponema pallidum*. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.35, p.29-54, 1981.

- FIUMARA, N.J. Reinfection Primary, Secondary, and Latent Syphilis: The Serologic Response after Treatment. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v.7, n.3, p.111-115, 1980.
- FLICHMAN, J.C. Sífilis I – Microbiologia e Imunologia. In: PASSOS, M.R.L. **DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis**. Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, 4^a ed., 1995, p.48-85.
- FRASER, C.M., NORRIS, S.J., WEINSTOCK G.M., WHITE, O., SUTTON, G.G. DODSON, R., GWINN, M., HICKEY, E.K., CLAYTON, R., KETCHUM, K.A., SODERGREN, E., HARDHAM, J.M., McLEOD, M.P., SALTZBERG, J., KHALAK, H., RICHARDSON, D., HOWELL, J.K., CHIDAMBARAM, M., UTTERBACK, T., McDONALD, L., ARTIACH, P., BOWMAN, C., COTTON, M.D., FUJII, C., GARLAND, S., HATCH, B. HORST, K., ROBERTS, K., SANDUSKY, M. WEIDMAN, J., SMITH, H.O., VENTER, J.C. Complete Genome Sequence of *Treponema palladium* Spirochete. **Science**, Washington, v.281, p.375-388, 1998.
- GENEST, D.R., CHOI-HONG, S.R., TATE, J.E., QURESHI, F., JACQUES, S.M., CRUM, C. Diagnosis of Congenital Syphilis From Placental Examination: Comparison of Histopathology, Steiner Stain, and Polymerase Chain Reaction for *Treponema pallidum* DNA. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.27, n.4, p.366-372, 1996.
- HANFF, P.A., FEHNIGER, T.E., MILLER, J.N., LOVETT, M.A. Humoral Immune Response in Human Syphilis to Polypeptides of *Treponema pallidum*. **J. Immunol.**, Baltimore, v.129, n.3, p.1287-1291, 1982.
- HANFF, P.A., NORRIS, S.J., LOVETT, M.A., MILLER, J.N. Purification of *Treponema pallidum*, Nichols Strain, by Percoll Density Gradient Centrifugation. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v.11, p.275-286, 1984.
- HASLETT, P., LAVERTY, M. The Prozone Phenomenon in Syphilis Associated with HIV Infection. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.154, p.1643-1644, 1994.

- HASS, J.S., BOLAN, G. LARSEN, S.A., CLEMENT, M.J., BACCHETTI, P., MOSS, A.R. Sensitivity of Treponemal Tests for Detecting Prior Treated Syphilis during Human Immunodeficiency Virus Infection. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.162, p.862-866, 1990.
- HANDSFIELD, C.M.M.H.H., KULLER, L., MORTON, W., LUKEHART, S.A. Alterations in the Course of Experimental Syphilis Associated with Concurrent Simian Immunodeficiency Virus Infection. **J. Infec. Dis.**, Chicago, v.165, p.1020-1025, 1992.
- HARTER, C.A., KURT, B. Fetal syphilis in the first trimester. **Am. J. Obstet. Gynecol.** Washington, v. 124, n. 7, p. 705-711, 1975.
- HAYES, N.S., MUSE, K.E., COLLIER, A.M., BASEMAN, J.B. Parasitism by Virulent *Treponema pallidum* of Host Cell Surfaces. **Infect. Immun.**, Washington, v.17, n.1, p.174-186, 1977.
- HENSEL, U., WELLENSIEK, H.J., BHAKDI, S. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Immunoblotting as a Serological Tool in the Diagnosis of Syphilitic Infections. **J. Clin. Microbiolog.**, Washington, v.21, n.1, p.82-87, 1985.
- HICKS, C.B., BENSON, P.M., LUPTON, M.D., TRAMONT, E.C. Seronegative Secondary Syphilis in a Patient Infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) with Kaposi Sarcoma. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.107, n.4, p.492-494, 1987.
- HOLT, S.C. Anatomy and Chemistry of Spirochetes. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.42, n.1, p.114-160, 1978.
- IJSSELMUIDEN, O.E., SCHOOLS, L.M., STOLZ,E., AELBERS, G.N.M., AGTERBERG, C.M., TOP, J., VAN EMBDEN, J.D.A. Sensitivity and Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using the Recombinant DNA-Derived *Treponema pallidum* Protein TmpA for Serodiagnosis of Syphilis and the Potential Use of TmpA for Assessing the Effect of Antibiotic Therapy. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27, n.1, p.152-157, 1989.

- IJSSELMUIDEN, O.E., VAN DER SLUIS, J.J., MULDER, A., STOLZ, E., BOLTON, K.P., VAN EIJK, R.V.W. . An IgM capture enzyme linked immunosorbent assay to detect IgM antibodies to treponemes in patients with syphilis. **Genitourin. Med.**, v.65, p.79-83, 1989.
- ISAACS, R.D., HANKE, J.H., GUZMAN-VERDUZCO, L.M., NEWPORT, G., AGABIAN, N., NORGDARD, M.V., LUKEHART, S.A., RADOLF, J.D. Molecular Cloning and DNA Sequence Analyses of the 37-kilodalton Endoflagellar Sheath Protein Gene of *Treponema pallidum*. **Infect. Immun.**, Washington, v.57, n.11, p.3403-3411, 1989.
- ITO, F., HUNTER, E.F., GEORGE, R.W., POPE, V., LARSEN, S.A. Specific Immunofluorescent Staining of Pathogenic Treponemes with a Monoclonal Antibody. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.4, p.831-838, 1992.
- JOHNS, D.R., TIERNEY, M., FELSENSTEIN, D. Alteration in the Natural History of Neurosyphilis by Concurrent Infection with the Human Immunodeficiency Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.316, p.1569-72, 1987.
- JONES, S.A., MARCHITTO, K.S., MILLER, J.N., NORGDARD, M.V. Monoclonal Antibody with Hemagglutination, Immobilization, and Neutralization Activities Defines an Immunodominant, 47000 Mol WT, Surface-Exposed Immunogen of *Treponema pallidum* (Nichols). **J. Exp. Med**, New York, v.160, p.1404-1420, 1989.
- KINGHORN, G. The re-emergence of syphilis. **Br. J. Hosp. Med.**, London, v.49, n.10, p.683-684 (Editorial), 1993.
- KIRALY, K. Immunoallergologic Aspects of Syphilis. **WHO/VDT/RES/73.304**. Geneve, p. 1-30, 1973.
- KIRCHNER, J.T. Syphilis - An STD on the Increase. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v. 44, n.3, p.843-854, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227,n.259, p.680-685, 1970.
- LARSEN, S.A., HUNTER, E.F., KRAUS, S.J. **A Manual of Tests for Syphilis**. Washington: A PHA, 1990, 191p.

- LARSEN, S.A., POPE, V., JOHNSON, R.E., KENNEDY, JR., E.J. **A Manual of Tests for Syphilis**. Washington: A PHA, 1998, 361p.
- LARSEN S.A., STEINER, B.M., RUDOLPH, A.H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.8, n.1, p.1-21, 1995.
- LARSEN, S.A., ZENKER, and P.N. Congenital Syphilis: Past, Present, and Future. **Clin. Microbiol. Newslet.**, Washington, v.12, p.181-182 (Editorial), 1990.
- LILLIE, R.D., FULMER, H.M. **Histopathologic thecnic and practical histochemistry**. 4.ed. New York: McGraw-Hill, 1976. p. 761.
- LUKEHART, S.A., BAKER-ZANDER, S.A., CHERI LLOYD, R.M., SELL, S. Characterization of Lymphocyte Responsiveness in Early Experimental Syphilis. **J. Immunol.**, Baltimore, v.124, n.1, p.461-467, 1980.
- MARRA, C.M., HANSFIELD, H.H., KULLER, L., MORTON, W.R., LUCKEHART, S. Alterations in the Course of Experimental Syphilis Associated with Concurrent Simian immunodeficiency Virus Infection. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, p.1020-1025, 1992.
- MARUTI, S. WANG,L.Y., ROSS, M., LEONARD, L., RAFFEL, J., HOLLINS, L. The epidemiology of early syphilis in Houston, Texas, 1994-1995. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v.24, n.8, p.475-80, 1997.
- MEHEUS, A., De SCHRYVER, A. Syphilis and blood transfusion: a global perspective. **Transfusion**, Philadelphia, v.30, n.9, p. 844-847, 1990.
- MEYER, M.P., EDDY, T., BAUGHN, R.E. Analysis of Western Blotting (Immunoblotting) Technique in Diagnosis of Congenital Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.3, p.629-633, 1994.
- MEYER, J.C. Laboratory Diagnosis of Syphilis. Elsner P. Eichmann A (eds): Sexually Transmitted Diseases Advances in Diagnosis and Treatment. **Curr. Probl. Dermatol.**, Basel, Karger. v.24, p.1-11, 1996.
- MOTER, A., HOENIG, C., CHOI, B.K., RIEP, B., GÖBEL, U.B. Molecular Epidemiology of Oral Treponemes Associated with Periodontal Disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.5, p.1399-1403, 1998.

- MOYER, N.P., HUDSON, J.D., HAUSLER JR. W.J. Evaluation of the Bio-EnzaBead Test for Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.25, n.4, p.619-623, 1987.
- NICHOLS, H.J., HOUGH, W.H. Demonstration of Spirochaeta Pallida in the Cerebrospinal Fluid. **JAMA**, Chicago, p.108-110, 1913.
- NORRIS, S.J., SELL, S. Antigenic Complexity of *Treponema pallidum*: Antigenic and Surface Localization of Major Polypeptides. **J. Immun.**, Baltimore, v.133, n.5, p.2686-2692, 1984.
- NORRIS, S.J. In Vitro Cultivation of *Treponema pallidum*: Independent Confirmation. **Infect. Immun.**, Washington, v.36, n.1, p.437-439, 1982.
- NUNES, J.P. **Contribuição para Garantia da Qualidade na Sorologia da Sífilis.** São Paulo, 1998. 87p. (Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP)
- OZANNE, G., D'HALEWYN, M.A., LARSEN, S.A. Comparison of the Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-ABS) Test with the FTA-ABS Double Staining Test for Detection of Antitreponemal Immunoglobulin M in the 19S Fraction of Human Serum. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.1, p.102-106, 1993.
- PARIS-HAMELIN, A. et CATALAN, F. Techniques de laboratoire applicables aux diagnostics des M.S.T. – **Institut Alfred Fournier. Librairie le François.** Paris, 1978, p.105.
- PASSOS, M.R.L., GOUVÊA, T.V.D., ALMEIDA FILHO, G.L. Sífilis II. In: PASSOS, M.R.L. **DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis.** Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, 4^a ed., 1995, p.86-124.
- PEDERSEN, N.S., ORUM, O., MOURITSEN, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) antigen in syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.25, n.9, p.1711-16, 1987.
- PICCIOLO, G.L., KAPLAN, D. Application of Quantitative Immunofluorescence to Clinical Serology: Antibody Levels of *Treponema pallidum*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.5, p.1294-1296, 1992.

- PROMED, EDR: Congenital Syphilis – Brasil. Woodall@wadsworth.org, 1996 [27/11/98].
- RADOLF, J.D., ROBINSON, E.J., BOURELL, K.W., AKINS, D.R., PORCELLA, S.F., WEIGEL, L.M., JONES, J.J., NORGDARD, M.V. Characterization of Outer Membranes Isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Spirochete. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.6, p.2154-2163, 1995.
- RADOLF, J.D., NORGDARD, M.V. SCHULZ, W. Characterization of Outer Membranes Isolated from *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.11, p.4244-4252, 1995.
- RADOLF, J.D., CHAMBERLAIN, N.R., CLAUSELL, A., NORGDARD, M.V. Identification and Localization of Integral Membrane Proteins of Virulent *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum* by phase Partitioning with the Nonionic Detergent Triton X-114. **Infect. Immun.**, Washington, v.56, n.2, p.490-498, 1998.
- RADOLF, J.D., LERNHARDT, E.B., FEHNIGER, T.E., LOVETT, M.A. Serodiagnosis of Syphilis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Purified Recombinant *Treponema pallidum* Antigen 4D. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.153, v.6, p.1023-1027, 1986.
- RADOLF, J.D., NORGDARD, M. V., SCHULZ, W.W. Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.86, p.2051-2055, 1989.
- RADOLF, J.D., STEINER, B., SHEVCHENKO, D. *Treponema pallidum*: doing a remarkable job with what it's got. **Trends in Microbiol.**, Cambridge, v.7, n.1, p. 51-53, 1999.
- REISNER, B.S., MANN, L.M., THOCKEN, C.A., WAITE, R.T., WOODS, G.L. Use of *Treponema pallidum*-Specific Captia Syphilis IgG Assay in Conjunction with the Rapid Plasma Reagin to Test for Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.5, p.1141-1143, 1997.
- ROBERTSON, S.M., KETTMAN, J.R., MILLER, J.N., NORGDARD, M.V. Murine Monoclonal Antibodies Specific for Virulent *Treponema pallidum* (Nichols). **Infect. Immun.**, Washington, v.36, n.3, p.1076-1085, 1982.

- ROLFS, R.T., NAKASHIMA, A.K. Epidemiology of Primary and Secondary Syphilis in the United States, 1981 Trough 1989. **JAMA**, Chicago, v.264, n.11, p.1432-1437, 1990.
- RUTGERS, S. Syphilis in pregnancy: a medical audit in a rural district. **Cent. Afric. Med.**, v.39, n.12, p.248-53, 1993.
- ROTHMAN, K.J. & BOICE, J. D. Epidemiologic analysis with a programmable calculator. **Epidemiology resources**, Boston. 1982, p.2432.
- SATO, N.S., TAKEDA, A.K. Antígeno Recombinante 47 kDa de *Treponema pallidum*: caracterização imunológica e estudo comparativo com antígeno nativo. **Rev. Bras. Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.28, n.1, p.8-11, 1996.
- SATO, N.S. **Pesquisa, Padronização e Avaliação da Reação de VDRL-ELISA na Triagem da Sífilis**. São Paulo, 1994. 99 p. (Dissertação de Mestrado. apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP).
- SATO, N.S. **Clonagem, Expressão e Caracterização de Antígenos Recombinantes do *Treponema pallidum* com Potencial Diagnóstico**. São Paulo, 1999. 129p. (Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP).
- SCHREIBER, W. MATHYS, F.K. **Infectio. Doenças Infectiosas na História da Medicina**. São Paulo, Edições “Roche” – Produtos Químicos e Farmacêuticos, 1991.
- SCHRIJVERS, D., JOSSE. R., TREBUCQ, A., DUPONT, A., CHERINGOU, H., LAROUZES, B. Transmission of syphilis between sexual partners in Gabon. **Genitourin. Med.**, London, v.65, p.84-85, 1989.
- SEIDL, S. Syphilis screening in the 1990s. **Trasfusion** (Editorial), Philadelphia, v.30, n.9, p.773-774, 1990.
- SELL, S., HSU, P.L. Delayed hypersensitivity, immune deviation, antigen processing and the T-cell subset selection in syphilis pathogenesis and vaccine design. **Immunology Today**, Cambridge, v.14, n.12, p.576-582, 1993.

- SELL, S., GAMBOA, D., BAKER-ZENDER, S.A., LUKEHART, S., MILLER, J.N. Host Response to *Treponema pallidum* in Intradermally - Infected Rabbits: Evidence for Persistence of Infection at Local and Distant Sites. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v.75, n.6, p.470-475, 1980.
- SILLETTI, R.P. Comparison of CAPTIA Syphilis G Enzyme Immunoassay with Rapid Plasma Reagin Test for Detection of Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.7, p.1829-1831, 1995.
- SINGH, A.E., ROMANOWSKI, B. Syphilis: Review with Emphasis on Clinical, Epidemiologic, and Some Biologic Features. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v. 12, n. 2, p. 187-209, 1999.
- STAMM, L.V., PARRISH, E.A. Characterization of the Low-Molecular-Mass proteins of Virulent *Treponema pallidum*. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, n.1, p.271-279, 1994.
- STEVENS, R.W, SCHMITT, M.E. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Treponemal Antibody. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.21, n.3, p. 399-402, 1985.
- TABOR, D.R., AZADEGAN, A.A., SCHELL, R.F., LEFROCK, J. Inhibition of Macrophage C3b-Mediated Ingestion by Syphilitic Hamster T Cell-Enriched Fractions. **J. Immunol.**, Baltimore, v.135, n.5, p.2698-2705, 1984.
- TANG, A., BARLOW, D. Resurgence of Heterosexually Acquired Early Syphilis in London. **Lancet**, London, p.166-167 (Letter), 1989.
- TELELAB – **Diagnóstico Sorológico da Sífilis**. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS/MS. Brasília, 1997, p.80.
- TERZIEVA-LAZAROVA, V.T., LICHEVA, E. PETROVA, E., KEHAYOV, I., KYURKCHIEV. Human Hybridomas Secreting Monoclonal Antitreponemal Antibodies Raised after in vitro Stimulation of Human Lymphocytes. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, Basel, v.106, p.32-37, 1995.
- TIKJOB, G., RUSSEL, M., SAND PETERSON,C., GERSTOFT, J., KOBAYASI, T. Seronegative secondary syphilis in a patient with AIDS: identification of *Treponema pallidum* in biopsy specimen. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v.24, n.3, p.506-508, 1991.

- TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.
- VAN DER SLUIS, J.J., ONVLEE, P.C., KOTHE, F.C. H.A., VUZEVSKI, V.D., AELBERS, G.M.N., MENKE, H.E. Transfusion Syphilis, Survival of *Treponema pallidum* in Donor Blood. **Vox. Sang.**, Basel, v.47, n.197-204, 1984.
- VAN DER SLUIS, J.J. **INVESTIGATIONS INTO THE OUTER SURFACE OF PATHOGENIC TREPONEMA PALLIDUM.** Rotterdam, Krips repro meppel, 1987. 128p.
- VILLANUEVA, A.V., PODZORSKI, R.P. Effects of Various Handling and Storage Conditions on Stability of *Treponema pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.7, p.2117-2119, 1998.
- VELDEKAMP, J., VISSER, A.M. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of syphilis. **Br. J. vener. Dis.**, London, v.51, n.4, p.227-231, 1975.
- WHANG, K.K., LEE, M.G., SONG, M.S, LEE, J.B. ELISA Inhibition Test Using Monoclonal Antibody Specific for *Treponema pallidum* as the Serologic Test for Syphilis. **Acta. Derm. Venereol. (Stockh)**, Oslo, v.75, p.397-399, 1995.
- WHITE, T.J., FULLER, S.A. Visuwel Reagin, a Non-Treponemal Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Serodiagnosis of Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27, n.10, p.2300-2304, 1989.
- WICHER, k., ABBRUSCATO, F., WICHER, V. SCHOULS, L. Immunization of Guinea Pigs with *Treponema pallidum* Recombinant Antigens Reveals the Presence of Novel Epitopes. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, Basel, v.103, p.396-399, 1994.
- YOUNG, H., MOYES, A. SEAGAR, L., McMILLAN. A. Novel Recombinant-Antigen Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Syphilis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.4, p.913-917, 1998.
- YOUNG, H., MOYES, A., McMILLAN, A. ROBERTSON, D.H.H. Screening for treponemal infection by a new enzyme immunoassay. **Genitourin. Med.**, London, v.65, p.72-78, 1989.