



SÍFILIS CONGÉNITA: CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO E AVALIAÇÃO DE  
TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA O SEU DIAGNÓSTICO

DAVID GONÇALO PINHO JANEIRO

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
MICROBIOLOGIA MÉDICA

JANEIRO DE 2012



Sífilis congénita: caracterização da infecção e avaliação de técnicas laboratoriais para o seu diagnóstico

David Gonçalo Pinho Janeiro

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Filomena Martins Pereira

Unidade de Doenças Sexualmente Transmitidas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Janeiro de 2012

## **Agradecimentos**

À Mui ilustre Professora Doutora Filomena Martins Pereira, que aceitou ser minha orientadora de mestrado, gostaria de exprimir a minha mais sincera gratidão. Os seus ensinamentos, a disponibilidade que sempre manifestou e o seu apoio, foi fundamental para o êxito do meu trabalho, e ainda a maneira calorosa como me recebeu e integrou na Unidade das DST's. À Mui ilustre Professora Doutora Rita Castro, que aceitou ser minha co-orientadora, gostaria de exprimir a minha mais sincera gratidão. Os seus ensinamentos, a disponibilidade, o apoio incondicional, a paciência e o tempo dispendido nos ensinamentos teóricos e laboratoriais ao longo do desenvolvimento deste estudo. À Dra. Emília Prieto pelo apoio incondicional, pela paciência e a colaboração incansável nos aspectos laboratoriais no desenrolar deste projecto. A todos os professores e técnicos auxiliares das Unidades de Virologia que tão bem me acolheram e integraram. Muito obrigado!

Aos meus colegas de laboratório, pelo apoio, motivação, compreensão e animação que tiveram para comigo, e agradecer também o companheirismo que existiu durante os inúmeros actos laboratoriais e o enorme prazer que tive em trabalhar convosco.

Aos meus amigos, pela força, compreensão, apoio e motivação que tiveram para comigo.

À minha namorada, pela paciência, força, empenho, motivação, ânimo e dedicação que inúmeras vezes me deu para a escrita e para o desenrolar desta tese.

Aos meus Pais, pela educação e a formação que me deram; o apoio incondicional que tiveram sempre que precisei; a força, o alento e o encorajamento para que fizesse sempre melhor; o meu obrigado por tudo!

## Resumo

Um dos maiores problemas da sífilis é a infecção intra-uterina do feto, que pode resultar em morte fetal com aborto espontâneo.

Os objectivos desta tese foram comparar os cinco testes serológicos para o diagnóstico de sífilis congénita e otimizar e aplicar a várias amostras clínicas, colhidas de indivíduos com suspeita de infecção por *Treponema pallidum*, uma técnica de PCR-Multiplex e uma técnica de PCR em tempo real.

Na globalidade dos soros estudados obtiveram-se os seguintes resultados: o RPR reactivo em 87/517; TPHA reactivo em 135/517; e EIA reactivo em 127/517. A pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM foi efectuada em 33 soros sendo estudada pelas técnicas de imunofluorescência indirecta e de westernblot. Quanto aos resultados obtidos pelas duas técnicas, o teste FTA-Abs-IgM demonstrou reactividade em 3/33, enquanto que a técnica de westernblot-M, apresentou reactividade em 18/33.

Para a avaliação de uma técnica de PCR-TR, foram estudadas 318 amostras de 236 indivíduos classificados, com base em critérios clínicos e laboratoriais, em diferentes estádios de infecção por *Treponema pallidum* e em indivíduos sem infecção por aquele microrganismo. Relativamente a estas técnicas foi possível observar amplificação de ADN de *Treponema pallidum* em 133/318 pela técnica de PCR-TR e 90/318 pela técnica de PCR-Multiplex.

Mediante os resultados obtidos e de outros estudos efectuados parece poder concluir-se que o teste EIA é o mais indicado para o rastreio da infecção por *Treponema pallidum*, devendo um resultado reactivo por esta técnica, ser confirmado com a realização de um teste não treponémico (RPR).

Relativamente ao diagnóstico de infecção congénita, o teste westernblot para pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM, parece ser o mais apropriado.

A técnica PCR-TR, parece ser a mais indicada, pois apresenta uma maior sensibilidade e especificidade que a PCR-Multiplex.

**Palavras-chave:** *Treponema pallidum*; sífilis congénita; testes serológicos; PCR em tempo-real; PCR-Multiplex.

## **Abstract**

The syphilis major problem is the intrauterine infection of the fetus, which may result in fetal death with spontaneous abortion.

The objectives of this thesis were to compare the five serological tests for the diagnosis of congenital syphilis and optimize and apply several clinical samples taken from individuals suspected of infection with *Treponema pallidum*, a PCR-Multiplex and real-time PCR.

In all sera studied were obtained the following results: the RPR reactive in 87/517; reactive TPHA in 135/517, and 127/517 in reactive EIA. The search for specific IgM antibodies was performed on 33 sera that were studied by indirect immunofluorescence and westernblot. The results obtained by both techniques, the test FTA-Abs-IgM showed reactivity in 3/33, while the technique westernblot-M, showed reactivity in 18/33.

For an RT-PCR evaluation, we studied 318 samples from 236 individuals classified based on clinical and laboratory criteria at different stages of infection by *Treponema pallidum* and in individuals without infection by that organism. For these techniques it was possible to observe ADN amplification of *Treponema pallidum* in 133/318 by RT-PCR and 90/318 by PCR-Multiplex.

Based on obtained results and in other studies seems that we can conclude that the EIA test is the most suitable for *Treponema pallidum* screening infection, and a reactive result by this technique, should be confirmed with the realization of a non-treponemal test (RPR).

For the congenital infection diagnosis, testing for antibodies westernblot specific IgM appears to be the most appropriate.

The RT-PCR seems to be the most suitable, since it has a higher sensitivity and specificity than the PCR-Multiplex.

**Keywords:** *Treponema pallidum*; congenital syphilis; serological tests; real-time PCR; PCR-Multiplex.

## Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	ix
Abreviaturas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Taxonomia e classificação.....	2
1.2 Características do género <i>Treponema</i> .....	2
1.3 Características morfológicas, estruturais e culturais de <i>Treponema pallidum</i> subespécie <i>pallidum</i> .....	3
1.4 Patogenicidade e imunidade.....	4
1.5 Transmissão e epidemiologia.....	4
1.6 Caracterização da evolução clínica da doença e manifestações clínicas.....	6
1.6.1 Sífilis primária.....	7
1.6.2 Sífilis secundária.....	7
1.6.3 Sífilis latente.....	8
1.6.4 Sífilis tardia.....	9
1.6.5 Sífilis tardia “benigna”.....	10
1.6.6 Sífilis congénita.....	10
1.7 Diagnóstico clínico e laboratorial da sífilis.....	12
1.8 Métodos serológicos.....	14
1.8.1 Testes não-treponémicos.....	14
1.8.2 Testes treponémicos.....	17
1.9 Métodos de biologia molecular.....	21
2. Tratamento.....	23
2.1 Terapêutica.....	23
2.2 Avaliação da eficácia do tratamento.....	24
2.3 Período de vigilância pós-terapêutica.....	25

3. Prevenção.....	26
4. Perspectivas futuras.....	28
5. Objectivos gerais.....	28
<b>Capítulo 2. Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
1.1 População e amostras.....	29
1.2 Preparação das amostras.....	29
1.3 Métodos.....	30
1.3.1 Teste serológico não específico.....	30
1.3.1.1 Teste RPR – “Rapid plasma reagin”.....	30
1.3.2 Testes serológicos específicos.....	32
1.3.2.1 Teste de hemaglutinação – TPHA.....	32
1.3.2.2 Teste imunoenzimático.....	33
1.3.2.3 Teste de imunofluorescência indirecta.....	35
1.3.2.4 Teste westernblot.....	36
1.3.3 Pesquisa de ADN de <i>Treponema pallidum</i> .....	39
1.3.3.1 Extracção de ADN total.....	39
1.3.3.2 Amplificação de ADN de <i>Treponema pallidum</i> – PCR Multiplex.....	40
1.3.3.3 Técnica de PCR em tempo real.....	42
<b>Capítulo 3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>46</b>
1. Caracterização da população.....	46
2. Testes Serológicos.....	51
2.1 Comparação dos testes não treponémicos.....	52
2.2 Comparação do teste não treponémico com os testes treponémicos.....	53
2.3 Comparação dos testes treponémicos.....	54
2.4 Pesquisa de anticorpos – <i>Treponema pallidum</i> – anti IgM.....	55
3. Testes serológicos – padrão de infecção.....	58
4. Amplificação de ADN de <i>Treponema pallidum</i> .....	62
4.1 Testes serológicos <i>versus</i> técnicas moleculares.....	66
<b>Capítulo 4. Conclusões.....</b>	<b>73</b>

<b>Capítulo 5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>76</b>
--	-----------

## Índice de figuras

Figura 1. Teste RPR. Exemplo de uma amostra positiva (representado por A+) e as respectivas diluições; e exemplo de uma amostra negativa (representado por A-).

Figura 2. Teste TPHA. Exemplo de uma amostra positiva (representado por C+) e as respectivas diluições (representado por T+); e exemplo de uma amostra negativa (representado por C-).

Figura 3. Teste Imunoenzimático. Exemplo de uma microplaca com 96 poços (poços com coloração amarela correspondem a amostras positivas; poços incolores correspondem a amostras negativas).

Figura 4. Teste de Imunofluorescência indirecta. Exemplo de uma amostra positiva evidenciando a espiroqueta *Treponema pallidum* fluorescente.

Figura 5. Teste Western-blot. Exemplo de duas tiras de membrana de nitrocelulose sensibilizadas com as proteínas TpN47; TmpA; TpN17 e TpN15 de *Treponema pallidum* (tira esquerda – exemplo de amostra negativa; tira direita – exemplo de amostra positiva).

Figura 6. Visualização, após electroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela técnica de PCR-Multiplex. (7 e 14 – marcador de peso molecular; 6 e 13 – controlo negativo; 4 – controlo positivo; 1 e 2 e 3 – amostras positivas; 5, 8-12 – amostras negativas).

Figura 7. Gráfico de PCR-TR mostrando as diferentes curvas de amplificação (1ª curva – controlo positivo de Tp 1:10; 2ª curva – controlo positivo de Tp 1:1000; 3ª curva – controlo positivo de Tp 1:100; 4ª curva – controlo negativo; restantes curvas – correspondem aos seguintes microrganismos: *Streptococcus B*; *Haemophilus ducrey*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus A*; *Chlamydia trachomatis*; *Leptospira sp.*).

Figura 8. Idade das mães parturientes.

Figura 9. Relação entre a idade das parturientes e o número de abortos.

Figura 10. Relação entre o número de mães parturientes com registo de aborto *versus* resultado reactivo num dos três testes (TPHA; EIA e FTA-Abs).

Figura 11. Relação das parturientes com a presença de infecção por VIH.

Figura 12. Resultados da relação entre o número de abortos e a seropositividade ou não das mães parturientes (Legenda: vermelho – um aborto; amarelo – dois abortos; roxo – nenhum aborto; laranja – nº parturientes que não sabiam ou não quiseram responder).

Figura 13. Idade das grávidas estudadas.

Figura 14. Reactividade dos soros estudados obtida com os testes RPR, TPHA e EIA.

Figura 15. Informação obtida sobre o teste VDRL nas mães parturientes.

Figura 16. Grupos de indivíduos estudados para avaliação das técnicas de PCR-TR e PCR-Multiplex.

Figura 17. Reactividade dos 318 soros estudados obtida com as técnicas de PCR-TR e PCR-Multiplex.

## Índice de tabelas

Tabela 1. Genes alvo, descrição dos *primers* e tamanho dos produtos de PCR amplificados, utilizados na técnica de PCR-Multiplex para a detecção de ADN de *Treponema pallidum*.

Tabela 2. *Primers* e sondas, utilizados na técnica de PCR-TR para a detecção de ADN de *Treponema pallidum*.

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos com os testes VDRL e RPR.

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e TPHA.

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e EIA.

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos com os testes EIA e TPHA.

Tabela 7. Comparação dos resultados obtidos com os testes TPHA e EIA.

Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos com os testes westernblot e FTA-Abs IgM.

Tabela 9. Número de casos de acordo com as diferentes combinações serológicas possíveis com os quatro tipos de testes utilizados neste estudo.

Tabela 10. Resultados obtidos com as técnicas PCR-TR e PCR-Multiplex.

Tabela 11. Sensibilidade e especificidade da técnica de PCR-Multiplex.

Tabela 12. Sensibilidade e especificidade da técnica PCR-TR.

Tabela 13. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados sem infecção.

Tabela 14. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis primária.

Tabela 15. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis secundária.

Tabela 16. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis latente recente.

Tabela 17. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis latente indeterminada.

Tabela 18. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis já tratada.

Tabela 19. Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex no indivíduo considerado com neurosífilis.

## Abreviaturas

ADN	-	Ácido desoxirribonucleico
ARN	-	Ácido ribonucleico
AW1	-	Tampão de lavagem 1
AW2	-	Tampão de lavagem 2
CDC	-	Centers for Disease Control and Prevention
DGSP	-	Direcção Geral de Saúde Portuguesa
dNTPs	-	Desoxinucleótidos trifosfatos
DO	-	Densidade óptica
DST	-	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	-	Ácido-tetra-acético
EIA	-	Enzyme immunoassay – técnica imunoenzimática
EUA	-	Estados Unidos da América
FTA-Abs	-	Fluorescent treponemal antibody absorption
GUD	-	Doença ulcerativa genital
IgG	-	Imunoglobulina de tipo G
IgM	-	Imunoglobulina de tipo M
IHMT	-	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
LCR	-	Líquido cefalorraquidiano
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de magnésio
NAATs	-	Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PBP	-	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	-	Reacção em cadeia da polimerase
PCR-TR	-	Técnica de PCR em tempo real
rpm	-	Rotações por minuto
RPR	-	Rapid Plasma Reagin
TAE	-	Tampão de eluição
TAL	-	Tampão de lise
TPHA	-	<i>Treponema pallidum</i> haemagglutination assay
TPI	-	Teste de Imobilização de <i>T. pallidum</i>

- TP-PA - *Treponema pallidum* particles agglutination
- VDRL - Venereal Diseases Research Laboratory
- VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

## 1. INTRODUÇÃO

A sífilis, uma doença sexualmente transmissível continua a ser um problema mundial, avaliando-se em 12 milhões o número de pessoas infectadas todos os anos, apesar de existirem medidas de prevenção eficazes como a utilização de preservativos, e opções de terapêuticas eficazes e relativamente baratas. (8,20,22,30,53,55,57,78)

Esta doença cujo agente etiológico é o *Treponema pallidum*, é altamente infecciosa e facilmente curável quando detectada nos estádios iniciais da infecção. No seu estágio inicial, de doença ulcerativa genital (GUD), pode evoluir desencadeando complicações significativas se não for tratada, e como qualquer doença ulcerativa genital, facilita a transmissão de outras doenças sexualmente transmissíveis, em particular a do vírus da imunodeficiência humana (VIH). (13,22,28,35,55,61,78,81)

As mulheres grávidas infectadas com sífilis podem transmitir a infecção ao feto, causando sífilis congénita, com consequências graves para a gravidez em 80% dos casos. (28,32,44,53,55,61,77)

Calcula-se que anualmente dois milhões de grávidas são afectadas; cerca de 25% destes casos resultam em nados-mortos ou abortos espontâneos; e outros 25% em recém-nascidos de baixo peso à nascença ou com infecção grave, estando qualquer destes casos associados a um maior risco de morte perinatal. No entanto, o problema da sífilis congénita ainda é geralmente subestimado, sabendo-se que há mais recém-nascidos afectados por sífilis congénita do que por qualquer outra infecção neonatal, inclusivé pelo VIH e tétano. (44,53,61,77)

Ao invés de muitas outras infecções neonatais, a sífilis congénita é uma doença evitável que pode ser eliminada graças a detecção pré-natal eficaz e tratamento das mulheres grávidas infectadas. Com intervenções relativamente simples orientadas para cuidados a mães e recém-nascidos, é possível obter-se uma grande redução nos casos de sífilis congénita. (23,28,30,35,44,55,54,78)

Ficou demonstrado que na suspeita de infecção sifilítica em mulheres grávidas a detecção e titulação das reaginas séricas, seguida de tratamento quando de título reagínico positivo, é uma intervenção eficaz, de baixo custo e viável para a prevenção da sífilis congénita, beneficiando a saúde infantil. (23,30,35,53)

A incidência de sífilis congênita pode ser reduzida de maneira importante com um conjunto relativamente simples de intervenções já definidas. Contudo, enquanto a sífilis for prevalente entre adultos, o potencial de transmissão congênita continuará alto. Assim, a eliminação sustentável da sífilis congênita exige esforços coordenados para reduzir simultaneamente as taxas da sífilis infecciosa. (23,30,35,44,53,55,78)

### **1.1 Taxonomia e classificação**

*Treponema pallidum* subespécie *pallidum* é o agente etiológico da sífilis, e é uma espiroqueta patogénica que pertence à Ordem *Spirochaetales*, Família *Spirochaetaceae*, Género *Treponema*. Nesta Ordem destacam-se como principais patogénicos humanos, além do género *Treponema*, o género *Borrelia* e o género *Leptospira*, mas o patogénico predominante entre as espiroquetas é o *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. (37,38,57,68,78)

### **1.2 Características do género *Treponema***

Os microrganismos do género *Treponema* são bactérias anaeróbicas facultativas que apresentam na sua constituição um cilindro protoplasmático, composto por protoplasma, membrana citoplasmática, uma camada de peptidoglicano e um espaço periplasmático com flagelos periplasmáticos. Estes, percorrendo longitudinalmente os microrganismos de extremo a extremo, confere-lhes mobilidade, realizando movimentos de rotação e translação. Estruturalmente estes microrganismos possuem uma parede celular similar à das bactérias de coloração Gram-negativa. Relativamente à sua morfologia, apresentam-se sob a forma de bacilos finos, helicoidais. Possuem cerca de meia-dúzia a uma dúzia de espiras regulares afiladas nas extremidades, sendo vulgarmente comparados a “saca-rolhas”. Devido às suas pequenas dimensões (0,1 a 0,5 µm de diâmetro por 6 a 20 µm de comprimento) são apenas visíveis por microscopia de fundo escuro ou microscopia electrónica. (6,37,57,68,78)

A espécie *Treponema pallidum* engloba quatro subespécies que revelam ser um problema para a saúde pública, uma vez que são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas doenças no Homem: *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* é o agente

etiológico da sífilis venérea, e apresenta uma distribuição geográfica mundial; *Treponema pallidum* subespécie *pertenue* responsável pela framboésia (boubas), com a distribuição geográfica predominante na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul; *Treponema pallidum* subespécie *endemicum* é o agente etiológico da sífilis endêmica não-venérea, e encontra-se distribuído geograficamente por África, Sudeste da Ásia e Médio Oriente; *Treponema pallidum* subespécie *carateum* é o agente da pinta, e tem uma prevalência geográfica pela América Central e América do Sul. (37,39,41,57,68,76)

### **1.3 Características morfológicas, estruturais e culturais de *Treponema pallidum* subespécie *pallidum***

*Treponema pallidum* subespécie *pallidum* é constituído por uma membrana dupla – externa e interna (ou citoplasmática). A membrana externa que compõe a superfície celular funciona como uma barreira de protecção relativamente ao meio envolvente. A membrana interna (ou citoplasmática), envolve o protoplasma é constituída fundamentalmente, por numerosas lipoproteínas imunogénicas, por proteínas de ligação à penicilina (PBP), e por cardiolipinas (fosfolípidos acídicos). (6,15,37,38,57,68)

Este microrganismo possui, ainda, três flagelos, vulgarmente denominados de flagelos periplasmáticos ou endoflagelos, que são estruturas localizadas no espaço periplasmático, sendo responsáveis pela locomoção, que lhe conferem o movimento helicoidal característico. (6,15,37,38,57,68,78)

O *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* é extremamente sensível às condições do meio envolvente (como a temperatura, oxigénio e pH), bem como a outros agentes físicos e químicos, o que não lhe permite sobreviver fora do seu hospedeiro natural. Assim sendo, um dos principais problemas a nível do processamento laboratorial consiste no facto de não ser possível cultivar *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* em meios de cultura ditos artificiais (sem células). O método amplamente utilizado de modo a manter e reproduzir este microrganismo *in vivo*, reside na inoculação em modelo animal de laboratório, habitualmente o coelho, porque apresenta um padrão de infecção idêntico ao do Homem. (6,15,37,38,57,68)

## 1.4 Patogenicidade e imunidade

A capacidade que *Treponema pallidum* tem de invadir e colonizar o hospedeiro encontra-se relacionada com a sua mobilidade, aderência, penetração e rápida disseminação hematogénica a partir do local de inoculação, assim como da sua capacidade de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro. Na presença deste microrganismo, desencadeia-se no hospedeiro uma resposta imunitária tanto de tipo humoral (produção de anticorpos contra antígenos treponémicos) como do tipo celular (alterações histológicas características das lesões sífilíticas). Assim sendo, na fase inicial da infecção por *Treponema pallidum*, a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o microrganismo resulta na produção de imunoglobulinas do tipo M e do tipo G (IgM e IgG) contra os antígenos de superfície. A produção das imunoglobulinas de tipo IgM é significativamente superior à das imunoglobulinas de tipo IgG (70% de IgM e 20% de IgG) e o seu aumento é mais precoce (7 a 20 dias) quando comparado com o das imunoglobulinas de tipo IgG (quarta semana). Efectuado o tratamento, as imunoglobulinas de tipo IgM específicas desaparecem de circulação, mas as imunoglobulinas de tipo IgG continuam a ser produzidas por células imunocompetentes com memória. (6,9,37,57,68,77,78)

## 1.5 Transmissão e epidemiologia

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível que atinge maioritariamente a população sexualmente activa situada na faixa etária compreendida entre os 20 e os 30 anos de idade. Esta infecção pode ser transmitida através das seguintes vias: contacto sexual (vaginal, oral, anal); introdução directa no sistema vascular mediante a partilha de agulhas ou transfusões sanguíneas; contacto cutâneo directo com lesões infecciosas, sendo nestes casos designada por sífilis adquirida; e por transferência placentária de espiroquetas, da mulher grávida infectada para o feto originando a sífilis congénita. (1,6,26,32,41,68,78)

O risco de infecção é aproximadamente de 30% aquando de contacto sexual com um parceiro infectado. *Treponema pallidum* é capaz de invadir as mucosas intactas bem como as áreas de pele com superfícies de continuidade. (1,6,41,68,78)

Embora exista tratamento anti-treponémico de sucesso, e apesar do vasto conhecimento de décadas da epidemiologia da doença, o problema da sífilis persiste e a incidência da infecção por *Treponema pallidum* é crescente. (37,53,68,78)

Consoante as áreas geográficas do globo a prevalência e a incidência da doença, variam significativamente, notando-se uma diferença acentuada entre os países desenvolvidos e os países em vias de desenvolvimento, continuando estes últimos a apresentar uma taxa de incidência superior relativamente aos primeiros. As maiores taxas de incidência de sífilis centram-se na África Subsaariana, Sul e Sudeste da Ásia, e América do Sul, com 3 milhões de casos em adultos que ocorrem anualmente nessas regiões, comparativamente a aproximadamente 100.000 casos na América do Norte, em 1999. (16,20,21,26,28,34,57,67,68,78)

Entre 1981 e 1989 a incidência de sífilis primária e secundária nos Estados Unidos da América (EUA) cresceu de 13,7 para 18,4 casos por 100.000 habitantes, o que se traduz num aumento de 34%, e em 1987 a sífilis congénita aumentou em 21%. (37)

Na história recente, os casos de sífilis descritos nos EUA atingiram o pico por volta de 1990, e os esforços para reduzir a incidência da doença resultaram numa redução dos casos notificados ao longo das décadas. Em 2000, a taxa foi a mais baixa desde que o relatório começou em 1941, mas apesar dos esforços visando a eliminação, a sífilis ressurgiu como uma ameaça à saúde pública em 2001, e várias taxas de casos têm aumentado gradualmente, principalmente devido a um ressurgimento da doença entre homens que fazem sexo com homens. Em 2008, a taxa nacional dos EUA de sífilis primária e secundária foi de 4,5 casos por 100.000 habitantes, um aumento de 18% a partir de 2007 (3,8 casos por 100.000 habitantes). O número mais elevado de casos de sífilis primária e secundária desde 1995 foi de 13.500 casos, com um aumento de quase 2000 casos em relação aos relatórios de 2007 (11.466 casos). (81)

Embora a maioria dos casos de sífilis nos EUA ocorram entre o grupo de homossexuais do sexo masculino, a sífilis entre o grupo dos heterossexuais também é um problema emergente. Nas mulheres, as taxas de sífilis primária e secundária continuam substancialmente menores do que nos homens, porém, as taxas têm aumentado a cada ano desde 2004. Em 2008, a taxa de sífilis entre as mulheres aumentou 36% em relação ao ano anterior (1,1 casos por 100.000 mulheres em 2007

contra 1,5 em 2008). Relativamente às taxas de sífilis congénita, estas mantiveram-se estáveis entre 2007 e 2008, após 2 anos de aumento. Foram descritos 431 casos de sífilis congénita em 2008 (10,1 casos por 100.000 nados vivos). (81)

Os casos de sífilis nos EUA demonstram uma significativa disparidade racial. Nos últimos 5 anos, o aumento de sífilis foi maior entre os indivíduos de raça negra do que nos indivíduos de raça caucasiana. A taxa de sífilis entre os indivíduos de raça negra foi aproximadamente oito vezes maior do que em indivíduos de raça caucasiana em 2008 (17,3 casos por 100.000 *versus* 2,2) e a taxa de casos de sífilis descritos entre os hispânicos foi o dobro da dos indivíduos de raça caucasiana. (81)

Em Portugal e em conformidade com a Direcção Geral de Saúde Portuguesa (DGSP), houve 120 casos de sífilis recente em 2006, o que corresponde a uma taxa de incidência de  $1.20/10^5$  da população, e 19 casos de sífilis congénita, que corresponde a uma taxa de incidência de  $0,13/10^5$  da população do mesmo ano. No entanto, quando dados inéditos de dermatologia clínica em Portugal são tidos em conta, verifica-se que a sífilis é altamente subnotificada. (13)

### **1.6 Caracterização da evolução clínica da doença e manifestações clínicas**

A sífilis é uma doença sistémica que não sendo tratada se torna uma doença crónica evoluindo por diferentes estádios sintomáticos e assintomáticos. (53,55,59,68)

A sífilis é então classificada como adquirida ou congénita. Sífilis adquirida é dividida em sífilis precoce e tardia. A sífilis precoce engloba as seguintes fases: primária, secundária e latente precoce. O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) define a sífilis precoce como sífilis adquirida à menos de um ano enquanto que a Organização Mundial de Saúde (OMS) define esse período em dois anos. A sífilis tardia engloba a sífilis latente tardia e a terciária (gomas, sífilis cardiovascular e neurosífilis). O CDC define sífilis tardia como sífilis adquirida à mais de um ano, e a OMS define-a como sífilis adquirida à mais de dois anos. A sífilis congénita é também dividida em precoce (primeiros 2 anos de vida) e tardia, a qual inclui os estigmas da sífilis congénita. (23,41,59)

### **1.6.1 Sífilis primária**

A fase primária da doença começa normalmente 21 dias (o período de incubação de 10 a 90 dias) após o contacto infeccioso. Esta fase abrange o desenvolvimento de uma lesão primária no local da inoculação, com maior frequência nos genitais, cuja reacção inflamatória origina uma lesão ulcerosa, denominada cancro. O cancro tem base lisa e limpa, com bordos elevados e firmes. A úlcera geralmente é indolor, embora possa ser algo sensível à palpação, e habitualmente dura 2 a 6 semanas. A exsudação é escassa, a não ser que haja infecção secundária do cancro. Normalmente, existe apenas um cancro primário, mas podem ocorrer múltiplas úlceras primárias nos doentes com síndrome de VIH. A base da úlcera contém espiroquetas que podem ser observadas por meio do microscópio de campo escuro ou de imunofluorescência a partir da realização de uma raspagem da lesão. Ocasionalmente, a sífilis pode ocorrer sem a existência de uma úlcera visível. Os gânglios linfáticos regionais encontram-se aumentados, sem sinais inflamatórios sendo indolores e firmes. O cancro regride no espaço de tempo de 3 a 6 semanas (com uma variação de 1 a 12 semanas). O diagnóstico laboratorial da sífilis primária depende da demonstração de espiroquetas na lesão por meio de microscopia de campo escuro ou de imunofluorescência directa, além dos testes serológicos. (22,23,26,36,37,41,43,53,68,78)

### **1.6.2 Sífilis secundária**

A fase secundária da infecção corresponde à disseminação generalizada e é a etapa mais ostensiva da doença existindo grande número de microrganismos em circulação e nas lesões. Esta fase inicia-se 2 a 8 semanas após o aparecimento do cancro e tem a duração de poucos dias, sendo seguida de uma fase latente de muitos anos, durante os quais não existem sinais nem sintomas. A apresentação mais evidente é a de uma erupção cutânea disseminada por todo o corpo, que envolve as palmas das mãos e as plantas dos pés podendo ser macular, maculopapular ou pustulosa, mas não vesicular, sendo na maior parte das vezes acompanhada de febre e dores musculares. Nas áreas intertriginosas húmidas, aparecem amplas placas húmidas, branco-acizentadas, denominadas condilomas planos, com abundância de espiroquetas infecciosas. Estas

espiroquetas podem ser observadas através do microscópio de campo escuro ou imunofluorescência em amostras colhidas por raspagem das lesões. De modo semelhante, podem ser observadas nas mucosas, lesões infecciosas, denominadas mucosas sífilides. Áreas pilosas podem também ser atingidas com zonas de alopecia do couro cabeludo e/ou adelgaçamento das sobrancelhas. (22,23,36,37,41,43,53,68,78)

Os sintomas sistémicos incluem linfadenopatia generalizada, febre e mal-estar geral. Nesta fase da doença, qualquer órgão pode ser envolvido na sífilis secundária, podendo resultar no desenvolvimento de queratite, hepatite e/ou osteíte. A infecção do sistema nervoso central ocorre em qualquer estágio da sífilis, mas é mais comum durante esta fase. Meningismo e cefaleia são comuns e pode surgir meningite asséptica. (22,23,36,37,41,68,78)

O limite entre as fases primária e secundária pode não ser totalmente nítido. Em alguns casos, o cancro ainda pode estar presente quando aparece a erupção secundária. (22,23,36,37,41,68,78)

O diagnóstico laboratorial da sífilis secundária é geralmente efectuado com facilidade por meio de técnicas serológicas, assim como pela demonstração de *Treponema pallidum* nas lesões. (22,23,36,37,41,59,68,78)

### **1.6.3 Sífilis latente**

Após a fase secundária, a doença pode tornar-se subclínica, embora não necessariamente inactiva. A fase latente é dividida num período inicial de 2 anos para a OMS e de 1 ano para o CDC, denominado de fase latente precoce, e um período latente tardio posterior. Durante a fase de latência precoce pode haver recaída, e o doente pode transmitir a infecção. Cerca de 90% das recaídas ocorrem durante o primeiro ano. O período de latência tardio tem duração indefinida e pode evoluir sem qualquer complicação. Durante o estágio de latência da sífilis a presença da doença apenas é detectada por métodos serológicos. (22,23,26,36,37,41,43,68)

#### 1.6.4 Sífilis tardia

As complicações da sífilis tardia incluem alterações do sistema nervoso central, anormalidades cardiovasculares e formação de tumores, denominados gomas, em qualquer órgão ou tecido. A neurosífilis tardia pode ser sintomática ou assintomática. A doença assintomática é um diagnóstico laboratorial sendo caracterizada por alterações do exame citoquímico do líquido cefalorraquidiano (LCR) com ausência de sintomas. Em geral, observam-se pleocitose, níveis elevados de proteínas ou níveis reduzidos de glicose no LCR. Uma prova serológica não-treponémica positiva, classicamente o teste Venereal Diseases Research Laboratory (VDRL) no LCR define a doença, embora raramente possam ser demonstradas espiroquetas por meio de cultura ou, mais recentemente, por métodos moleculares. A infecção sintomática é de tipo meningovascular ou parenquimatosa, mas existe uma considerável superposição de categorias. A sífilis meningovascular é semelhante à meningite asséptica do estágio secundário. Qualquer nervo craniano pode estar afectado pela inflamação, resultando no desenvolvimento de surdez e alterações visuais. A doença parenquimatosa pode envolver os neurónios do cérebro ou da medula espinal. O comprometimento cerebral manifesta-se como uma ampla variedade de alterações neuropsiquiátricas, incluindo alterações físicas, como paralisia, e problemas psiquiátricos, como as ilusões de grandeza. A doença, denominada tabes dorsal, inclui um caminhar “abrupto” peculiar e deformação dos joelhos. (23,36,37,68,78)

O intervalo entre a doença primária e as complicações neurológicas é de 5 a 10 anos no caso da paralisia geral e de 25 a 30 anos para a tabes dorsal. (37)

A lesão cardiovascular da sífilis terciária, aortite sífilítica, ocorre em cerca de 10% dos casos não-tratados. É causada pela inflamação dos pequenos vasos que nutrem a aorta (endarterite sífilítica) e afecta primariamente a aorta ascendente. Duas complicações podem daí resultar: aneurisma aórtico e dilatação do anel aórtico, o que causa insuficiência cardíaca e regurgitação sanguínea através da válvula aórtica. Os aneurismas aórticos podem evoluir a uma dimensão tal que produzem erosões através do esterno. (22,23,36,37,68,78)

A única prova universalmente reconhecida para o diagnóstico de neurosífilis é o teste VDRL adaptado para o LCR. Infelizmente, este teste é pouco sensível, mas outros testes serológicos tendem a ser inespecíficos. (37,68)

### **1.6.5 Sífilis tardia “benigna”**

Esta lesão da infecção caracteriza-se pela formação de lesões granulomatosas inespecíficas denominadas gomas, sendo a complicação mais comum da sífilis tardia que ocorre em cerca de 15% dos doentes não-tratados. A formação do granuloma indica resposta imune celular completamente activa, podendo destruir os tecidos circundantes à medida que aumenta de tamanho. Do ponto de vista clínico, as gomas são lesões maciças destrutivas que ocorrem em qualquer órgão e que no início colocam problema de diagnóstico diferencial com carcinoma. (37,68)

### **1.6.6 Sífilis congénita**

Um dos maiores problemas da sífilis é a infecção intra-uterina do feto. Como reflexo do aumento de casos de sífilis na população em geral, a sífilis congénita aumentou de maneira equilibrada desde 1983. A infecção transplacentária ocorre com maior probabilidade durante os estágios primário e secundário da sífilis. As espiroquetas podem infectar o feto em qualquer momento durante a gravidez, mas a probabilidade de surgir uma doença clínica aumenta à medida que a gravidez progride. (18,37,68)

A infecção fetal pode resultar em morte fetal com aborto espontâneo, geralmente após o primeiro trimestre, ou em mortalidade tardia de nados vivos em 30 a 40% dos casos; parto prematuro ou de termo, de recém-nascidos com sinais evidentes de infecção ou totalmente assintomáticos (aproximadamente  $\frac{2}{3}$  dos casos de nados vivos). (18,68,78)

Clinicamente a sífilis congénita pode ser semelhante a uma infecção congénita originada por citomegalovírus, toxoplasmose, vírus herpes simplex e rubéola, bem como sépsis bacteriana, incompatibilidade do grupo sanguíneo, e outras numerosas condições neonatais. (18,26,68,78)

A sífilis congénita pode ser dividida em duas síndromes clínicas: sífilis congénita precoce, quando sintomas e sinais surgem nos primeiros dois anos de vida, e sífilis congénita tardia quando aqueles aparecem mais tarde durante as duas primeiras décadas de vida. A sífilis congénita precoce é diagnosticada durante os dois primeiros anos de vida, e inclui os nadomortos. A sífilis congénita tardia refere-se aos casos em que sintomas e sinais aparecem após os dois anos de idade, sendo que geralmente se manifesta perto da puberdade, afectando principalmente os ossos, dentes e sistema nervoso. (18,23,26,32,36,68,78)

A sífilis congénita precoce pode ser diagnosticada em qualquer momento antes dos dois anos de idade, mas uma revisão da literatura indica que esta geralmente surge no período neonatal, e raramente mais tarde do que os 3 a 4 meses de vida. A maioria dos recém-nascidos afectados estão assintomáticos à nascença, desenvolvendo-se dois terços de sintomas pelas 3 a 8 semanas. (18,23,26,32,68,78)

Relativamente aos sintomas clínicos de infecção congénita, os mais característicos são a prematuridade e o baixo peso à nascença (10-40% das crianças), hepatomegália com ou sem esplenomegália (33-100%), erupção cutânea (40%) e alterações ósseas observáveis ao raio-X (75-100%), como a deformação das tíbias (tíbias em sabre). Outros sinais precoces incluem pseudoparalisia, desconforto respiratório, hemorragias, alterações dentárias (molares muriformes) e febre. (18,23,26,32,36,68,78)

O exame clínico é importante, no entanto, estima-se que até 60% das crianças com sífilis congénita são assintomáticas à nascença. Portanto, o diagnóstico num recém-nascido só pode ser efectuado através de uma revisão dos testes da mãe e história de tratamento, associados às manifestações clínicas e laboratoriais. (18,23,26,32,36,68,78)

Nenhum teste de diagnóstico laboratorial por si só permite diagnosticar sífilis congénita, e é considerado anti-ético não tratar um bebé em risco de infecção, mesmo sem a existência de um diagnóstico definitivo. Não devem ser utilizadas amostras de sangue do cordão umbilical. Os testes de diagnóstico laboratoriais como os imunoenaios enzimáticos e os testes “immunoblotting” para a deteção de imunoglobulinas de tipo IgM específicas assim como a técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Treponema pallidum* tornaram o diagnóstico laboratorial da sífilis fetal mais sensível e específico,

pelo que as evidências clínicas como a hepatomegália, icterícia e alterações ósseas podem ser resolvidas no prazo de 3 meses após o nascimento, se às crianças sintomáticas for efectuada a terapêutica. (23,32,36,68,78)

A interpretação dos testes serológicos (treponémicos e não-treponémicos) para o diagnóstico de infecção congénita é difícil. As crianças sintomáticas nascidas de mães seropositivas não-tratadas requerem tratamento antimicrobiano. Se a mãe recebeu tratamento adequado com penicilina, a infecção congénita é improvável, e o latente deve ser acompanhado com rigor clínico e laboratorial. A reactividade do teste VDRL geralmente desaparece em 6 meses e a do teste de Fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-Abs) no espaço de um ano. Na ausência de evidência clara de tratamento adequado da mãe, está indicado o tratamento empírico do latente. (23,26,37,68)

### **1.7 Diagnóstico clínico e laboratorial da sífilis**

O diagnóstico de infecção sífilítica congénita ou adquirida, é suspeito com base em dados clínicos e confirmado pela identificação directa de treponemas em amostras clínicas e/ou pela reactividade dos testes serológicos. (8,23,39,43,55,59,68,78)

Actualmente os métodos disponíveis para a identificação directa de *Treponema pallidum* em amostras clínicas obtidas a partir de um cancro primário ou de lesões secundárias activas são: a microscopia de campo escuro; os ensaios de imunofluorescência directa; o teste de infecciosidade no coelho, ou a pesquisa de ADN de *Treponema pallidum*. (3,39,43,55,59,68,70,78)

O método que continua a ser o teste padrão de referência sendo o mais sensível e fiável para a detecção de *Treponema pallidum* em amostras clínicas é o teste de infecciosidade no coelho por inoculação intra-testicular da amostra a estudar. Este teste fornece evidências definitivas fiáveis de *Treponema pallidum*, mas o seu uso no diagnóstico de rotina é inviável porque é caro, laborioso e necessita de condições especiais para a utilização e manutenção de animais, não estando amplamente disponível. O procedimento é penoso e demorado, requerendo vários meses para a subcultura do material testicular, para confirmação do resultado inicial. Por motivos

óbvios, este método mantém-se como uma ferramenta de investigação. (3,32,39,43,68,70,78)

Na sífilis primária, antes que os anticorpos se tornem detectáveis, a pesquisa directa de espiroquetas no cancro é a única forma de diagnóstico. O método tradicional é o exame com microscópio de campo escuro do material raspado da superfície da lesão. A observação da motilidade das espiroquetas é essencial para a diferenciação de *Treponema pallidum* de espiroquetas saprófitas. Assim, o exame microscópico deve ser realizado de imediato após colheita da amostra, condição esta difícil para a maioria dos laboratórios clínicos. Não se recomenda o exame de lesões orais devido à frequente presença de treponemas saprófitas na cavidade oral. As lesões cutâneas e viscerais da sífilis secundária contêm usualmente um grande número de espiroquetas, as quais podem ser demonstradas por microscopia de campo escuro a partir de raspagens dessas lesões. (3,37,39,43,59,68)

A microscopia de campo escuro também tem sido utilizada para o estudo do líquido amniótico de modo a confirmar a infecção fetal. Este método baseia-se em amostras frescas e de boa qualidade, sendo a presença de espiroquetas no líquido amniótico um marcador de doença fetal grave. (3,32,39,43,59,68)

Um procedimento alternativo mais satisfatório do que o exame com microscópio de campo escuro é a demonstração da presença de espiroquetas nas lesões por meio do teste de imunofluorescência directa. O ensaio com base na imunofluorescência é equivalente ao exame com campo escuro, quando a sensibilidade e a especificidade é muito mais versátil, já que a colheita pode ser efectuada durante a observação clínica e depois enviada para laboratório, sendo aplicável a amostras de biópsia ou de tecidos. (3,37,39,43,55,59,68)

Contudo, a incapacidade de demonstrar o microrganismo quer por esta técnica quer pela microscopia não exclui o diagnóstico de sífilis congénita. (3,23,32,39,55,59,68,80)

A detecção de ADN de *Treponema pallidum* por técnicas de PCR no líquido amniótico, soros neonatais e LCR neonatal revelou ser um método alternativo e sensível (76-86%), com uma especificidade de 100% para o diagnóstico de sífilis congénita quando comparado com o teste de infectividade do coelho, revelando-se uma

importante ferramenta adicional à microscopia de campo escuro e serologia treponémica. (3,23,32,39,55,59,68,80)

O diagnóstico laboratorial definitivo da sífilis é efectuado pela demonstração da presença de *Treponema pallidum* nas amostras clínicas por intermédio de testes directos. Um diagnóstico provável de sífilis é considerado quando: - os testes serológicos específicos ou inespecíficos são reactivos na presença de manifestações clínicas compatíveis com sífilis; - o teste VDRL é reactivo no LCR; - um teste treponémico específico é reactivo numa criança de idade superior aos 15 meses de idade. Quando não é possível o diagnóstico laboratorial definitivo (demonstração do agente), os testes treponémicos específicos devem ser utilizados para confirmar a suspeita baseada nas manifestações clínicas ou nos testes não treponémicos positivos. (3,12,23,39,68,78,80)

## **1.8 Métodos serológicos**

Os testes serológicos utilizados para o diagnóstico laboratorial da sífilis podem ser divididos em dois grupos: testes não-treponémicos e testes treponémicos. Cada grupo tem características distintas que os tornam úteis para diferentes propósitos, sendo complementares, e não exclusivos entre si. Os testes não-treponémicos são inespecíficos sendo mais úteis para o rastreio de infecção. Os testes treponémicos são testes específicos que devem ser utilizados para a confirmação de um teste não-treponémico reactivo ou em situação de grande suspeita clínica de sífilis, em que o teste não-treponémico foi negativo. (3,10,11,23,37,39,43,55,59,68,74,78,79,81)

### **1.8.1 Testes não-treponémicos**

Os testes não-treponémicos pesquisam anticorpos contra lípidos tecidulares, sobretudo a cardiolipina, libertados no decurso de infecção por *Treponema pallidum* ou por outros treponemas assim como em resposta a doenças que resultam em lesões de células teciduais. A associação foi reconhecida precocemente no século XXI, quando foi desenvolvida uma variedade de testes de fixação do complemento. Entre os testes de

uso actual, predominam os de flocculação que utilizam como antigénio uma forma de cardiolipina purificada em lipossomas de lecitina-colesterol. (8,23,39,55,59,78,81)

As técnicas utilizadas com maior frequência são: o teste VDRL e o teste Rapid Plasma Reagin (RPR). Estes utilizam o mesmo tipo de antigénio, cardiolipina associada ao colesterol e lecitina, contudo no caso do RPR foi ainda adicionado cloreto de colina e ácido-tetra-acético (EDTA), que tornou desnecessária a descomplementação dos soros, e a incorporação de partículas de carvão que permite a visualização macroscópica da reacção, tornando-o de mais fácil execução e visualização que o teste VDRL. (8,10,11,12,23,37,39,43,55,59,81)

Os testes não-treponémicos apresentam uma sensibilidade de 70 a 99%, conforme o estágio da doença. Podem não ser positivos durante a fase inicial de sífilis primária, devendo ser repetidas após uma semana, um mês e três meses, quando obtido resultado negativo em doente com suspeita de infecção. A sensibilidade destes testes é cerca de 100% durante a fase secundária. (8,11,37,39,49,55,59)

Relativamente a este tipo de testes é de referir que o soro de doentes com grande quantidade de anticorpos pode produzir o fenómeno de prozona, em que um soro não diluído não apresenta reactividade, enquanto que esta vai surgindo com a diluição do mesmo. Este fenómeno resulta da alta concentração de anticorpos, que bloqueia ou torna a reacção antigénio-anticorpo incompleta pelo que não ocorre reacção de precipitação ou flocculação. Os resultados falso-positivos causados pelo fenómeno de prozona apresentam-se como uma preocupação clínica devendo-se suspeitar estar na presença deste fenómeno quando da aparência “grumosa” do antigénio flocculado. Qualquer soro que produza esse aspecto grumoso deve ser titulado. Além disso, o soro deve ser diluído e reavaliado se, no doente com testes negativos, houver uma suspeita clínica firme de infecção. Na população em geral, a frequência de reacções de prozona é tão baixa que a diluição rotineira do soro não compensa o custo. (3,8,23,37,39,55,59,81)

Os testes não-treponémicos são afectados pela terapêutica anti-treponémica pelo que são úteis para o seguimento da progressão da doença e da resposta ao tratamento. Quando reactivo um teste não treponémico deve ser titulado até uma diluição de ponto final. Este título estabelece uma linha de base de reactividade a partir da qual pode ser monitorizada a infecção. (3,8,23,37,39,55,59,81)

Se o título de anticorpos não-treponémicos não diminui progressivamente com o tratamento, deve ser considerada a possibilidade de fracasso terapêutico. Deve haver pelo menos uma redução de quatro vezes neste título aos três meses após tratamento anti-treponémico. Os doentes tratados durante o estágio tardio da sífilis ou com reinfeção podem desenvolver títulos que declinam mais lentamente ou permanecem estáveis. Alguns desses doentes podem apresentar testes não-treponémicos positivos para toda a vida, mesmo após instituição de nova terapêutica, sendo considerados seropositivos crônicos. (3,8,23,37,39,55,59)

O teste VDRL é um dos métodos não-treponémicos de escolha, sendo positivo em aproximadamente 80% dos casos de sífilis primária e em 95% dos casos de sífilis secundária e é o único teste serológico aprovado para testar a reactividade do LCR, sendo a utilização deste teste serológico exclusivo e universalmente aceite para o diagnóstico da neurosífilis. (12,39,59,78,80)

O teste RPR é positivo em aproximadamente 85% dos casos de sífilis primária e em 98% dos casos de sífilis secundária. As aplicações do teste RPR são semelhantes às do VDRL, excepto que o RPR não deve ser utilizado para avaliar o LCR. A simplicidade do teste RPR levou muitos laboratórios a adoptá-lo como uma análise de rastreio primária. (12,23,37,39,55,59,80)

A especificidade dos testes não-treponémicos é em média de 98%, com variação entre 93 a 99%. A falta de especificidade é um problema sobretudo quando os testes são empregues para o rastreio de populações com baixa prevalência de sífilis, em cujo caso as reacções positivas são provavelmente falsas. Reacções de falsa positividade ocorrem em casos de doentes com outras infecções treponémicas, assim como em doentes com doenças que induzem a formação de anticorpos anti-cardiolipina. Esses “falso-positivos biológicos” podem ser transitórios, usualmente devidas a infecções virais, ou persistentes, em geral relacionados com doenças imunológicas. Também foram referidas reacções “falso-positivas biológicas” em indivíduos consumidores de drogas intravenosas, uma população em situação de maior risco para a aquisição de infecção e em doentes com infecção por VIH. Portanto, uma reacção positiva com um teste não-treponémico deve ser sempre confirmada com um teste treponémico específico. (3,8,10,23,37,39,43,49,55,59,61)

### 1.8.2 Testes treponémicos

Os testes treponémicos utilizam como antígeno *Treponema pallidum* ou algum dos seus componentes, pesquisando assim anticorpos específicos. O teste padrão de referência era o teste de imobilização de *Treponema pallidum* (TPI), no qual a motilidade de treponemas vivos virulentos era inibida pela presença de anticorpos específicos do soro do doente. Este teste custoso e difícil de ser realizado foi substituído por uma técnica de fluorescência na qual a absorção dos soros a estudar com treponemas de Reiter permite eliminar reacções inespecíficas (FTA-Abs). Subsequentemente, foi desenvolvido outro teste específico, um teste de hemaglutinação passiva, que utiliza como antígeno eritrócitos sensibilizados com extractos de *Treponema pallidum* (TPHA). (3,10,23,37,39,43,55,59,74,81)

O TPHA tem vindo a ser substituído pelo teste de aglutinação (TP-PA), o qual é actualmente mais utilizado que o teste de imunofluorescência FTA-Abs, sendo mais simples de execução e de leitura que aquele, o qual necessita de utilização de microscópio de fluorescência para observação dos resultados. Estes testes são positivos em 75% (TP-PA) a 85% (FTA-Abs) dos doentes com sífilis primária e em 100% dos doentes com sífilis secundária. (3,8,10,23,39,43,55,59,78,81)

O teste TP-PA é um teste qualitativo para a detecção de anticorpos contra o *Treponema pallidum* no soro ou no plasma. Este teste baseia-se na aglutinação de partículas de gelatina coloridas sensibilizadas com o antígeno *Treponema pallidum* e tem substituído o seu antecessor, o teste TPHA, apesar de utilizar o mesmo tipo de antígeno treponémico oferece a vantagem da utilização de partículas de gelatina em vez de eritrócitos, eliminando assim as reacções inespecíficas. Por outro lado não é tão caro e é menos complicado em termos de execução e interpretação que o teste de imunofluorescência FTA-Abs, sendo os resultados lidos macroscopicamente, pelo que é um dos testes treponémicos mais comumente utilizado. (3,8,10,23,39,43,55,59,81)

O teste FTA-Abs apresenta uma taxa de positividade mais elevada na sífilis precoce do que os testes não-treponémicos, sendo a taxa de positividade próxima a 100% no estágio secundário. Permanece reactivo durante o resto da vida do doente não sendo a reactividade afectada pelo tratamento anti-treponémico. Portanto, o teste FTA-Abs é útil para o rastreio de sífilis tardia, mas não pode ser utilizado para a

monitorização do resultado do tratamento. O grau de positividade do teste FTA-Abs não tem qualquer significado biológico, pelo que os soros positivos não são titulados. A sua especificidade é muito elevada. Com poucas excepções, não ocorrem as “reações falso-positivas biológicas” dos testes não-treponémicos. O soro de alguns doentes, especialmente daqueles com lúpus eritematoso sistémico ou outras doenças do tecido conjuntivo, podem produzir uma reacção de coloração incomum em forma de pérolas. Quando o teste FTA-Abs é empregue para o rastreio de populações com prevalência muito baixa de sífilis, podem ocorrer reacções falso-positivas, mesmo com este teste muito específico. (3,10,23,37,39,43,55,59,81)

Uma variação do teste FTA-Abs é o procedimento de dupla coloração. O teste é muito semelhante ao FTA-Abs, excepto que opta pela utilização de anticorpos anti-treponémicos de tipo IgG conjugados com rodamina para visualizar as espiroquetas, enquanto que no teste FTA-Abs clássico é utilizada a iluminação de campo escuro para essa visualização. Os resultados dos procedimentos tradicional e de dupla coloração são comparáveis. (23,37,39,43,55,59,81)

O teste FTA-Abs pode ser adaptado para a detecção de anticorpos de tipo IgG ou de tipo IgM específicos. Uma vantagem de detecção de anticorpos de tipo IgM está em comprovar a infecção *in utero*. As imunoglobulinas da classe G atravessam a placenta e penetram na circulação fetal, o que não ocorre com os anticorpos de tipo IgM. Estes são elaborados pelo feto *in utero*; pelo que, a detecção de anticorpos de tipo IgM anti-treponémicos específicos num recém-nascido indica infecção intra-uterina. Entretanto, os ensaios para pesquisa de IgM específicas têm problemas potenciais, e deve ser tomada a importante precaução de validar um determinado ensaio antes do seu uso. Se houver antiglobulinas, como factor reumatóide ou anticorpos anti-iodotipo, no soro fetal, pode ocorrer reacção falso-positiva. Por outro lado quando presentes em quantidades excessivas, os anticorpos de tipo IgG podem bloquear os locais de ligação aos antígenos produzindo reacções “falso-negativas”. (3,23,31,37,39,43,55,59,74,81)

No teste TPHA também são empregues antígenos específicos de *Treponema pallidum*. O teste é consideravelmente menos complicado do que o FTA-Abs e não requer microscópio de fluorescência. Apresenta desempenho semelhante ao do procedimento fluorescente, mas é menos sensível na sífilis precoce. (10,23,37,39,43,55,59,81)

As reacções de falsa reactividade dos testes treponémicos são raras, mas podem ocorrer em doentes infectados por outras espiroquetas, incluindo a doença de Lyme, leptospirose ou mesmo por outras espécies patogénicas de *Treponema*. Os testes treponémicos normalmente mantêm-se positivos para o resto da vida do doente, mas os seus títulos não se correlacionam com a presença de doença activa. (23,39,59,78,81)

Com as técnicas de “immunoblot”, cerca de dez diferentes proteínas treponémicas são identificadas pelos anticorpos específicos presentes nos soros de adultos e/ou crianças infectadas. O método “immunoblot” para pesquisa de IgM específicas é muito eficaz na confirmação de sífilis congénita em crianças sintomáticas, apresentando sensibilidade de 83-100%. Em estudos efectuados em amostras de recém-nascidos assintomáticos com suspeita de sífilis congénita, 4-22% apresentaram reactividade no teste “immunoblot” para pesquisa de IgM específicas. Os padrões de reactividade para essa pesquisa foram semelhantes para as crianças assintomáticas e sintomáticas. Este teste foi mais sensível que o teste FTA-Abs para a pesquisa de IgM específicas quando utilizado para o rastreio de recém-nascidos com suspeita de sífilis congénita, não se tendo observado nenhuma reactividade nos grupos de controlo (recém-nascidos de mães adequadamente tratadas ou saudáveis e controlos de crianças com sintomas semelhantes, mas com outras causas), resultando em especificidade de 100%. (3,23,31,32,39,55,59,74)

Uma grande número de testes treponémicos de tipo ensaio imunoenzimático (EIA) estão disponíveis comercialmente, incluindo o Sífilis G Captia, Sífilis M Captia e Sífilis G Captia select, teste da sífilis SpiroTek, Sífilis Enzygnost, e Sífilis G Bio-Rad. O teste de Sífilis G Captia detecta anticorpos de tipo IgG, e pode ser usado tanto como um teste de rastreio como de confirmatório, sendo considerado um substituto apropriado para o teste TPHA. (29,39,55,59)

O teste de sífilis M Captia foi projectado para detectar anticorpos de tipo IgM como objectivo de auxiliar no diagnóstico de sífilis congénita, e estudos efectuados demonstram ser mais sensível que o teste FTA-Abs 19S IgM; sendo também considerado adequado para o diagnóstico de sífilis precoce. (29,39,55,59)

O teste Sífilis SpiroTek foi o que apresentou a maior sensibilidade de todos os testes treponémicos (especialmente na sífilis primária não tratada) e é recomendado como um teste confirmatório pelo CDC. (29,39,55,59)

Os testes EIA para a pesquisa de anticorpos anti-treponémicos têm demonstrado sensibilidade e especificidade global igual ou melhor do que os testes FTA-Abs e TP-PA. Além disso, estes testes são passíveis de automatização, eliminando a variação e a subjectividade do leitor humano. Devido a estas vantagens muitos laboratórios passaram a utilizá-los para o rastreio da infecção. Contudo esta estratégia apresenta a desvantagem de não permitir a diferenciação entre doença activa e doença no passado, visto que os testes treponémicos permanecem reactivos na maioria dos doentes para o resto das suas vidas. Por esta razão, o CDC actualmente recomenda que, se os testes EIA forem utilizados para o rastreio em todos os casos de teste EIA reactivos, deve ser realizado o teste RPR, e se este for não reactivo, deve realizar-se um segundo teste treponémico como o TP-PA ou FTA-Abs. (3,11,23,29,39,43,55,58,59,62,81)

Os testes EIA foram também avaliados para a detecção de anticorpos de tipo IgM no diagnóstico de sífilis congénita quer sintomática, quer assintomática. A maioria destes testes utilizam como antigénio extractos sonicados de *Treponema pallidum* ou uma mistura de antigénios clonados, tendo-se observado uma sensibilidade (88-100%) e especificidade (100%) elevadas, assim como resultados de pesquisa de IgM específicas positivos em cerca de 3-7% de recém-nascidos assintomáticos com suspeita de sífilis congénita. Poucos estudos têm comparado os testes EIA IgM com o teste “immunoblot”-IgM. Os testes imunoenzimáticos parecem ser ligeiramente menos sensíveis que os testes “immunoblot” na pesquisa deste tipo de anticorpos. No entanto, o EIA IgM é uma alternativa aceitável para os laboratórios que têm menos experiência com a técnica “immunoblot”, sendo mais fácil de executar. (3,11,23,29,32,39,43,55,58,59,62,81)

Comercialmente os testes treponémicos também estão disponíveis em formatos de tipo teste rápido. Estes são testes de execução simples e leitura fácil que não requerem equipamento especializado e podem ser realizados em centros de saúde de cuidados primários, por pessoal técnico com um mínimo de treino. Eles estão disponíveis quer como teste de aglutinação, utilizando partículas de látex revestidas com antigénios treponémicos, quer como tiras imunocromatográficas em que a reacção positiva aparece como uma linha colorida. A maioria destes testes podem ser usados com sangue total, soro ou plasma. Podem ser armazenados a temperatura ambiente, são simples de executar, podendo os resultados ser lidos visualmente em menos de 30

minutos. Mais de 20 tipos de testes rápidos estão disponíveis comercialmente, mas nenhum foi aprovado para uso na América do Norte, uma vez que não contém um controlo de qualidade interna, é recomendado o controlo de qualidade periódico externo através de testes em laboratório. (3,23,39,46,55,56,59)

### **1.9 Métodos de biologia molecular**

Uma série de métodos baseados na reacção da polimerase em cadeia têm sido desenvolvidos para a detecção de ADN de *Treponema pallidum* em amostras clínicas. Embora estes métodos não estejam padronizados, eles parecem ser altamente sensíveis, capazes de detectarem o valor mínimo de 1 a 10 organismos por amostra apresentando também elevada especificidade. A técnica de PCR poderá ser um teste de escolha para o diagnóstico laboratorial de sífilis congénita, neurosífilis e sífilis primária inicial onde os testes tradicionais apresentam uma sensibilidade limitada. (3,13,24,39,55,59,70,77)

A técnica de PCR identifica *Treponema pallidum* pela amplificação de sequências de ADN ou de ácido ribonucleico (ARN) específicas deste microrganismo. Pode ser realizada a partir de esfregaços de lesões, aspirado dos nódulos linfáticos, LCR, sangue, líquido amniótico, e amostras de tecidos fixado ou não. Contudo, a sensibilidade varia bastante com o tipo de amostra e estágio de infecção e a especificidade, enquanto intrínsecamente muito alta, depende da escolha dos *primers*, da habilidade do técnico que executa, do tipo de amostra e tratamento. (3,13,24,39,55,70,78,80)

A técnica de PCR em tempo real (PCR-TR) baseia-se na detecção do material amplificado por corantes fluorescentes que se encontram ligados a sondas oligonucleotídicas. Durante esta técnica é possível detectar os produtos amplificados através das intensidades de fluorescência. É uma técnica rápida e fiável, que apresenta um grande potencial para o diagnóstico de sífilis primária, especialmente em contextos em que não é possível realizar microscopia de campo escuro. As vantagens de uma técnica de PCR-TR têm a ver com a capacidade de detectar o microrganismo directamente, com um tempo de resposta curto, e uma facilidade de desempenho. (24,33,42)

A técnica de PCR-TR para pesquisa de ADN de *Treponema pallidum* é de fácil execução e permite que não se leve em consideração o período de janela serológica da sífilis, que pode ser de até 3 meses. Tanto a técnica de PCR-TR como a microscopia de campo escuro identificam directamente a espiroqueta, sem o uso de um parâmetro indirecto, como a produção de anticorpos (serologia de sífilis). (24,33,42)

## 2. Tratamento

Com o decorrer do tempo, vários fármacos e metodologias foram propostos para o tratamento da sífilis. (37,68,75,78,79)

### 2.1 Terapêutica

A penicilina G parentérica continua a ser o fármaco de eleição para a terapêutica em todos os estádios da sífilis tendo sido o único fármaco que demonstrou ser eficaz para a terapêutica de doentes com neurosífilis, sífilis congénita, ou sífilis durante a gravidez. Não foram ainda referidos qualquer caso de resistência de *Treponema pallidum* à penicilina. Três esquemas básicos são utilizados para as crianças: 10 a 14 dias de penicilina procaína por via intramuscular; 10 a 14 dias de penicilina aquosa administrada por via intravenosa; e uma única dose de penicilina benzatínica por via intramuscular. A escolha de um destes três esquemas é determinada pelas manifestações clínicas e pela probabilidade de se poder efectuar ou não a monitorização da resposta ao tratamento. Em situações de reacções alérgicas graves à penicilina, as crianças devem ser dessensibilizadas e tratadas com penicilina. Recomendações para o tratamento podem mudar nos próximos anos devendo-se dar mais informação de apoio quanto à utilização das cefalosporinas de terceira geração (não recomendado actualmente) podendo estas tornarem-se disponíveis. (2,6,26,41,68,71,75,78,79)

A reacção de Jarisch-Herxheimer, que se manifesta por febre, cefaleias, mialgias, e mau-estar, ocorre em alguns doentes 2 a 12 horas depois de receberem tratamento para sífilis recente (especialmente nos estágios iniciais). A reacção parece resultar da libertação de compostos não-treponémicos do tipo endotoxina durante a lise treponémica mediada pela penicilina. Esta reacção é um evento raro em recém-nascidos, mas pode ocorrer numa etapa mais tardia da infância e para além da mesma. (2,6,24,41,68,75,78,79)

## 2.2 Avaliação da eficácia do tratamento

Não foram estabelecidos critérios definitivos para o sucesso ou fracasso do tratamento, e a avaliação da resposta ao tratamento geralmente é difícil. Além disso, é difícil diferenciar fracasso terapêutico de reinfecção. Geralmente, a eficácia da terapia é monitorizada pela remissão dos sintomas quando existentes e pelo declínio no título de anticorpo de um teste não-treponémico. Títulos sequenciais desses anticorpos devem ser avaliados utilizando o mesmo tipo de teste no mesmo laboratório. Uma diminuição no título pós-tratamento confirma a resposta favorável ao tratamento, e um aumento no título indica insucesso terapêutico ou reinfecção. Tipicamente, o título de anticorpos anti-cardiolipina deverá declinar quatro vezes após três meses (por exemplo, de 1:32 para 1:8) e por oito vezes após seis meses (por exemplo, de 1:32 para 1:4) com a terapia padrão. No entanto, há evidências de que 15% dos doentes tratados para sífilis precoce não irão demonstrar uma diminuição, de quatro vezes no título, em um ano pós-tratamento. O tempo para a diminuição do título de anticorpo pode ser mais longo com o teste RPR do que com o teste VDRL. (6,26,59,79)

A coinfeção por VIH pode atrasar o declínio do título tanto na sífilis primária como na secundária. As directrizes do CDC sugerem que a falha em obter uma redução de quatro vezes no título de anticorpo aos seis meses após a terapia no caso de sífilis primária e secundária, e aos 12 a 24 meses no caso de sífilis latente, com títulos iniciais elevados, identifica doentes com risco de falência terapêutica. (6,26,59,79)

A seroconversão é um processo lento que depende do estágio da doença e uma série de outras condições. Por isso, a taxa de declínio no título é mais útil do que a seroreversão. Para diferenciar a seroreversão, o soro do doente deve ser examinado em cada 3-6 meses pelo menos durante 2 anos. Considera-se que a terapêutica foi efectuada com sucesso aquando após um ano os testes RPR ou VDRL negativam em doentes com sífilis primária, após dois anos em doentes com sífilis secundária, e após cinco anos em sífilis latente. Não obstante, em alguns doentes, particularmente aqueles tratados em estádios latentes ou tardios, os anticorpos não-treponémicos podem persistir com títulos baixos por um longo período de tempo, às vezes por toda a vida, e sendo esta reacção referida como uma “reacção serofast”. Por outro lado, mesmo sem tratamento, o doente pode tornar-se serologicamente negativo após vários anos. (6,26,59,79)

O teste VDRL pode ser negativo em até um quarto dos doentes com sífilis tardia não tratada. (6,26,59)

Os títulos de anticorpos treponémicos correlacionam-se fracamente com a actividade da doença e não devem ser usados para monitorizar o tratamento. (6,26,59)

A técnica de PCR pode ser útil para descartar uma infecção persistente. (6,26,59)

### **2.3 Período de vigilância pós-terapêutica**

As crianças devem ser reavaliadas após o tratamento de sífilis congénita aos 1,2,3,6 e 12 meses de idade. Os testes não-treponémicos devem ser repetidos em cada 2-3 meses até que se tornem não-reactivos ou o seu título diminua quatro vezes. Quando os anticorpos não-treponémicos são de origem materna, os títulos normalmente negativam em 3 meses, devendo mesmo ser negativos aos 6 meses de idade se a criança não tiver sido infectada. Se os títulos de anticorpos não-treponémicos permanecerem estáveis ou aumentarem após 6 e 12 meses de idade, a criança deverá ser reavaliada (incluindo análise ao LCR) e tratada com um regime terapêutico de 10 dias de penicilina G parentérica. (2,26,32,78,79)

Os anticorpos treponémicos específicos de origem materna podem persistir até aos 12 a 15 meses em 15% das crianças não infectadas nascidas de mães seropositivas, tornando estes testes de pouca ajuda diagnóstica durante a infância. A permanência de reactividade em idade de 18 meses ou mais é indicativo de infecção congénita. (2,26,32,78,79)

Os latentes com neurosífilis congénita, LCR anormal ou não interpretável e contagem de leucócitos ou concentração de proteínas ou teste de VDRL do LCR positivo devem efectuar as avaliações clínicas e avaliações do LCR a cada 6 meses até que os índices de LCR sejam normais. Um teste VDRL de LCR reactivo em qualquer avaliação aos 6 meses é indicação para instituição de nova terapêutica, o mesmo está indicado quando a contagem de leucócitos do LCR não apresentar um declínio constante em cada exame ou permanecer anormal aos 2 anos. (2,26,78,79)

### 3. Prevenção

A sífilis congénita encontra-se sob controle em grande parte dos países mais ricos do mundo, mas a sífilis durante a gravidez continua a ser um problema trágico e substancial em muitos países em vias de desenvolvimento. (72)

A sífilis congénita pode ser prevenida através da detecção da infecção na mulher grávida. Programas dirigidos para a promoção de sexo seguro ou para o controlo de infecções sexualmente transmissíveis na comunidade ajudam a prevenir a infecção materna, mas, se uma mulher infectada ficar grávida, os programas de rastreio apenas podem evitar os efeitos da infecção materna sobre o feto. Contudo estes programas devem na mesma ser implementados, embora não necessariamente de forma exclusiva, durante o período de melhoramento dos cuidados pré-natais. (66)

Para uma melhor prevenção, devem ser definidas estratégias de saúde pública destinadas a reduzir o fardo da sífilis congénita o que requer a identificação precoce da infecção em mulheres grávidas através de rastreio, tratamento adequado da mulher, e identificação e tratamento dos parceiros infectados, assim como pela modificação de comportamentos de alto risco e promoção de acesso e utilização dos cuidados de saúde, particularmente no início pré-natal. Uma vez que a incidência de sífilis congénita está relacionada com a prevalência de sífilis na população, estas estratégias têm de ser complementadas por programas de prevenção, controle e gestão das doenças sexualmente transmissíveis, como preconizado pela OMS. (64)

Idealmente, todas as mulheres devem ser rastreadas durante o primeiro trimestre com um teste não-treponémico (teste RPR ou VDRL) e novamente no início do terceiro trimestre, mesmo em populações de baixa prevalência. Uma melhor abordagem seria testar novamente as mulheres em situação de alto risco ou mulheres de áreas de alta prevalência às 28 semanas de gestação e outra vez mais perto do parto, uma vez que a infecção primária pode ocorrer após o rastreio, e existe a possibilidade de reinfeção (especialmente se os parceiros não forem tratados). No mínimo, o objectivo deve ser assegurar que toda a mulher grávida efectuou um teste de rastreio no início da gravidez, e se isso não acontecer, que ela seja testada no momento do parto ou logo após, como recomenda a OMS. (64)

A solução para o problema da dissociação entre o resultado do teste e a administração do tratamento consiste na utilização de testes no local de consulta pela equipa de enfermagem em clínicas pré-natais. A viabilidade e eficácia de custo de um programa de rastreio para a sífilis executado por uma equipa de enfermagem tem sido bem demonstrada. Os benefícios do teste efectuado no local são de que, atrasos na recepção dos resultados vão ser assim removidos, o que leva a um tratamento mais precoce particularmente das mães que frequentam a clínica no final da gravidez, e mães com teste positivo e que sejam identificadas imediatamente, eliminando a necessidade de rastreios caros e pouco fiáveis. Para ter sucesso, estes programas exigem armazenamentos adequados de testes para diagnóstico de sífilis, pessoal treinado e experiente e uma boa supervisão, a fim de manter a motivação da equipa de trabalho. (64)

Assim sendo, todas as mulheres grávidas devem ser submetidas a um rastreio serológico no início da gravidez e novamente no momento do parto. Mulheres em elevado risco para a infecção por sífilis devem repetir o teste novamente às 28 semanas de gestação. (66)

A nível internacional, a prevenção da sífilis congénita deve ser uma prioridade do sistema de saúde e as seguintes medidas devem ser fornecidas: estimativas da carga global de sífilis congénita, a defesa activa para a prevenção da sífilis congénita, a avaliação de políticas globais de programas de prevenção da sífilis congénita, e um programa de orientação para os programas nacionais de prevenção. (66)

Os testes para o diagnóstico de sífilis congénita devem ser adicionados aos serviços essenciais recomendado para as mulheres grávidas. (66)

A nível nacional, deve-se desenvolver uma política que resulte no testar e tratar todas as mulheres grávidas para infecção por *Treponema pallidum*. Um programa de teste universal de mulheres grávidas deve ser uma prioridade política e de saúde. As consequências económicas e sociais da sífilis congénita argumentam fortemente a favor da sua prevenção considerando-a como uma prioridade de intervenção de cuidados de saúde, e uma intervenção importante de modo a melhorar os cuidados pré-natais. (66)

#### **4. Perspectivas futuras**

O desenvolvimento de uma vacina para prevenir a sífilis representaria um grande avanço e proporcionaria uma base para a eliminação da doença no mundo, porque não existe reservatório noutros hospedeiros, que não o homem. O genoma foi completamente sequenciado fornecendo assim pistas para a obtenção de uma vacina eficaz a médio-longo prazo. (22,37,78)

O desenvolvimento de um método de cultura *in vitro* também pode ser um passo importante, algo que a avaliação genómica pode facilitar. Enquanto isso, o desenvolvimento de testes de diagnóstico mais baratos e a obtenção de fundos para programas de rastreio pré-natal, pesquisas, e antibioterapia de todas as pessoas identificadas com sífilis pode ser um longo caminho para atingir esse objectivo, mesmo na ausência de uma vacina. Este, como muitos outros problemas de saúde pública, implicarão boa vontade e cooperação internacional a todos os níveis, por parte dos governos de todo o mundo. (22,37,78)

#### **5. Objectivos gerais**

Tendo em conta as dificuldades existentes no que diz respeito ao diagnóstico de infecção a *Treponema pallidum*, a presente tese tem como principais objectivos:

- comparar as técnicas serológicas específicas e não específicas utilizadas para o diagnóstico de sífilis congénita;
- otimizar uma técnica de PCR clássica e outra técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico de sífilis congénita.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.1 População e amostras**

Neste estudo foram caracterizados um total de 517 amostras de soro de diferentes grupos populacionais: parturientes para rastreio, grávidas e recém-nascidos com suspeita de infecção.

As amostras das parturientes foram colhidas em Luanda, no espaço temporal compreendido entre Dezembro de 2010 e Março de 2011, na Maternidade Lucrecia Paim de Luanda.

Após a obtenção de consentimento informado por parte das parturientes foi também colhida amostra do respectivo recém-nascido.

As amostras de grávidas e de recém-nascidos, com suspeita de sífilis foram colhidas na Maternidade Alfredo da Costa e no Hospital São Francisco Xavier em Lisboa.

Uma técnica de PCR-TR implementada e otimizada no laboratório das DST (doenças sexualmente transmissíveis) do IHMT (Instituto de Higiene e Medicina Tropical), foi também avaliada pelo estudo de diversos tipos de amostras de doentes em diferentes estádios de infecção pelo *Treponema pallidum* e de indivíduos sem infecção por este microrganismo.

### **1.2 Preparação das amostras**

Para proceder à colheita das amostras serológicas, punccionou-se uma veia periférica das parturientes, enquanto que nos recém-nascidos a amostra foi obtida por punção do cordão umbilical. Após coagulado, o sangue colhido foi centrifugado, durante 10 minutos a 2500 rotações por minuto (rpm), tendo sido obtido o soro, que de seguida foi colocado em tubos “eppendorfs”. Estes foram devidamente rotulados e envolvidos em parafilme, sendo armazenados a -20°C. Posteriormente foram embalados, armazenados e acondicionados com gelo seco numa caixa de transporte de amostras biológicas a uma temperatura de -20°C, para a conseqüente viagem até Lisboa.

No próprio dia da chegada a Lisboa, as amostras foram transportadas para o laboratório de DST do IHMT, onde foram guardadas numa arca refrigeradora a -70°C.

### **1.3 Métodos**

Neste estudo procedeu-se à pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* em todas as amostras de soro, por um teste serológico não-específico, RPR e pelos testes serológicos específicos, TPHA, e imunoenzimático.

Nas amostras em que se obtiveram resultados positivos, duvidosos ou discrepantes para qualquer um dos testes anteriores, procedeu-se à realização do teste serológico específico, o teste de imunofluorescência indirecta FTA-Abs.

Nas amostras de recém-nascidos com testes serológicos reactivos, efectuou-se ainda a pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM por uma técnica de Westernblot.

A identificação de *Treponema pallidum* foi efectuada por pesquisa de ADN deste microrganismo mediante a utilização de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs).

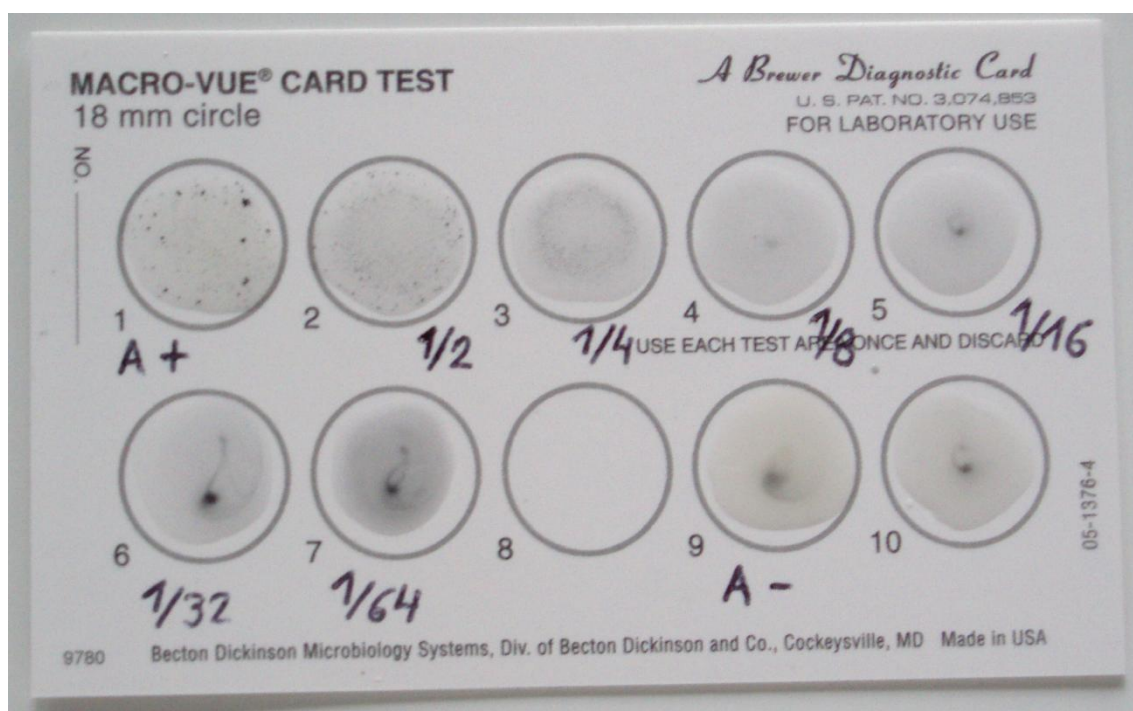
#### **1.3.1 Teste serológico não-específico**

##### **1.3.1.1 Teste RPR – “Rapid Plasma Reagin”**

A pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* não específicos foi efectuada pelo teste de floculação RPR “Macro-Vue<sup>R</sup> RPR Card Tests”. É um teste que utiliza um antigénio constituído por uma suspensão estabilizada de partículas de carbono, composta por 0,003% de cardiolipina, 0,09% de colesterol, 0,020 a 0,022% de lecitina, 0,02% de carbono, 0,0125 M de EDTA, 0,01 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10% de cloreto de colina. As partículas de carbono permitem que a reacção anticorpo-antigénio seja visível macroscopicamente, o cloreto de colina torna desnecessária a inactivação dos soros antes do procedimento, aumentando a reactividade do antigénio e o EDTA é responsável pela estabilização antigénica, evitando assim a preparação do mesmo previamente à realização do teste.

O teste foi efectuado conforme o protocolo estabelecido pela casa comercial.

Com uma micropipeta colocou-se 50µl de soro fisiológico no segundo círculo do cartão fornecido pelo kit. Posteriormente, adicionou-se 50µl de amostra não diluída ao primeiro círculo do cartão e outros 50µl de amostra não diluída ao segundo círculo do cartão (que já continha soro fisiológico) seguido de uma homogeneização, descartando-se 50µl. Espalhou-se a amostra por toda a superfície do círculo. Adaptou-se ao frasco de antigénio a respectiva agulha, agitou-se a suspensão durante 10 a 15 segundos e colocou-se sobre as amostras dos primeiro e segundo círculos uma gota de antigénio. O cartão foi colocado num agitador rotatório automático a 100 rpm, durante 8 min, após o que se procedeu à leitura sob boa fonte luminosa. O teste foi considerado positivo quando se visualizou aglutinação (floculação) forte a mínima, e negativo na sua ausência. A totalidade das amostras com resultado reactivo foram tituladas mediante a mesma metodologia do teste qualitativo, mas efectuando-se diluições seriadas de factor dois (50µl de amostra não diluída e 50µl de soro fisiológico), e assim sucessivamente, até se atingir um ponto final em que a reacção foi negativa. Registou-se como título o valor da maior diluição em que se observou reactividade (figura 1).



**Figura 1.** Teste RPR. Exemplo de uma amostra positiva (representado por A+) e as respectivas diluições; e exemplo de uma amostra negativa (representado por A-).

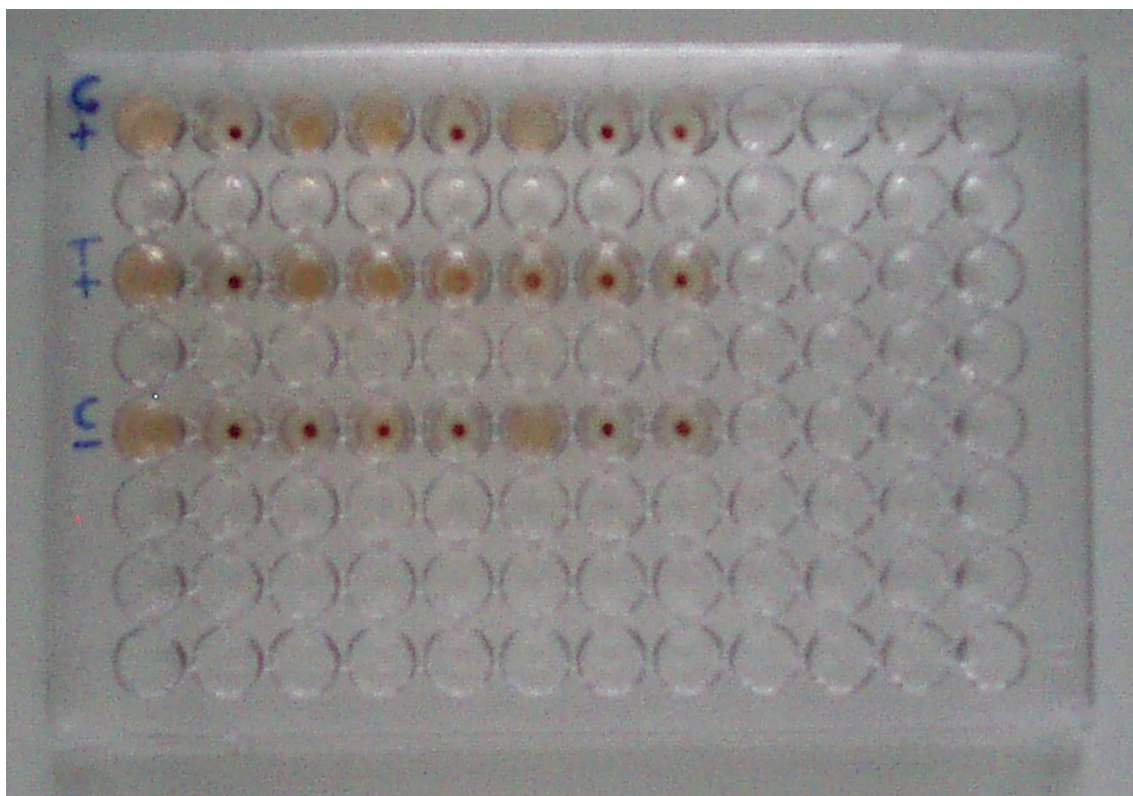
### **1.3.2 Testes serológicos específicos**

#### **1.3.2.1 Teste de hemaglutinação – TPHA**

O teste de hemaglutinação executado neste trabalho foi o “Lab21 Healthcare Ltd, TPHA Tests”, que utiliza como células teste, eritrócitos de galinha conservados e sensibilizados com antígenos de *Treponema pallidum* (estirpe de Nichols) e como células controlo, eritrócitos de galinha não sensibilizados que permitem verificar a presença de reactividade inespecífica.

A técnica foi efectuada segundo o protocolo fornecido pela casa comercial.

Para o rastreio das amostras, colocou-se 190µl de diluente e 10µl de amostra não diluída no primeiro poço da microplaca fornecida e homogeneizou-se bem. Depositou-se 75µl de células de controlo (eritrócitos não sensibilizados) no segundo poço e 75µl de células de teste (eritrócitos sensibilizados) no terceiro poço. Transferiu-se 25µl da amostra diluída para o poço de controlo (segundo poço) e outros 25µl da amostra diluída para o poço de teste (terceiro poço), homogeneizando-se sempre. A incubação decorreu à temperatura ambiente e protegida da luz, durante 60 min. O teste foi considerado reactivo quando se observou uma aglutinação, e negativo quando não se visualizou qualquer aglutinação, o que se reflectia na sedimentação dos eritrócitos em forma de “botão” no fundo do poço da microplaca. Todas as amostras positivas foram quantificadas por sucessivas diluições de factor dois a partir da amostra diluída (1:80), utilizando as células teste. Como título da amostra, foi considerado o valor de maior diluição em que se observou hemaglutinação. De referir que, quer no rastreio, quer na quantificação das amostras, foi sempre utilizado um controlo positivo e um controlo negativo (figura 2).



**Figura 2.** Teste TPHA. Exemplo de uma amostra positiva (representado por C+) e as respectivas diluições (representado por T+); e exemplo de uma amostra negativa (representado por C-).

### 1.3.2.2 Teste imunoenzimático

O teste imunoenzimático utilizado neste trabalho para a detecção de anticorpos específicos de tipo IgG, foi o do kit comercial SYPHILIS EIA 96 tests, do Lab21 Healthcare Ltd. Este teste utiliza como antigénio uma mistura de proteínas recombinantes de *Treponema pallidum* (15 kDa; 17 kDa e 47 kDa) fixadas nos 96 poços da microplaca (figura 3).

Para a realização do teste seguiu-se as instruções da casa comercial.

A primeira etapa consistiu na adição de 50µl de controlo negativo em dois poços, 50µl de controlo positivo em três poços, ambos fornecidos pelo kit e 50µl de cada amostra de soro a estudar não diluída, nos restantes poços. Posteriormente, adicionou-se 50µl de solução de conjugado a cada um dos 96 poços da mesma placa e colocou-se numa plataforma agitadora durante 30 seg., seguido de uma incubação a 37°C, durante 30 min. Finalizada a etapa de incubação, procedeu-se à lavagem dos

poços com o tampão de lavagem, repetindo-se este passo 5 vezes, tendo sempre o cuidado de aguardar 30 seg. entre cada lavagem. De seguida, adicionou-se 50µl de solução de substrato em todos os poços e incubou-se à temperatura ambiente, protegido da luz, durante 30 min. Finalizado este tempo, colocou-se 50µl de solução de paragem na totalidade dos poços e procedeu-se à leitura da placa no espectrofotómetro Anthos Reader HT2 da Anthos labtec instruments, com espectro de comprimento de onda de 450 nm.

A técnica foi validada pela introdução dos dois controlos negativos e dos três positivos, considerando-se fiável quando a média dos controlos negativos foi igual ou inferior a 0,080 de densidade óptica (DO), e a dos positivos igual ou superior a 1000 DO.

Quando o valor da absorvância foi inferior ao valor de absorvância do “cut-off” foi considerado como resultado negativo, e positivo quando o valor da absorvância foi superior ao valor de absorvância do “cut-off”.



**Figura 3.** Teste Imunoenzimático. Exemplo de uma microplaca com 96 poços (poços com coloração amarela correspondem a amostras positivas; poços incolores correspondem a amostras negativas).

### 1.3.2.3 Teste de imunofluorescência indirecta

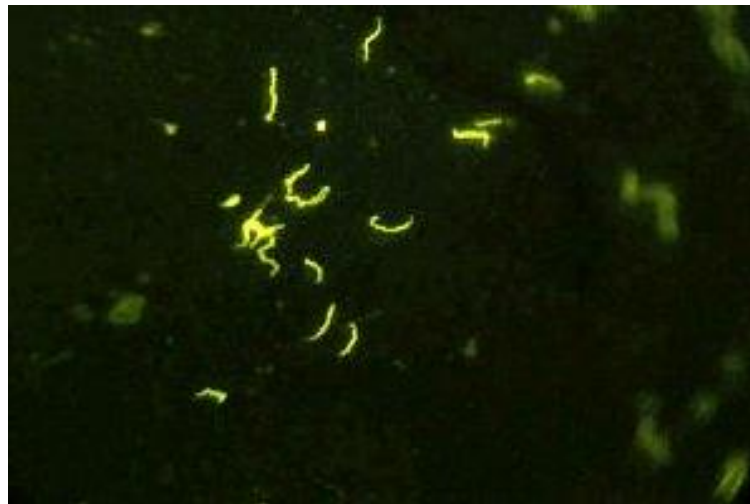
Todas as amostras com resultados positivos, discrepantes e duvidosos pelos testes anteriormente descritos (RPR; TPHA; EIA) foram estudadas pelo teste de imunofluorescência indirecta, o FTA-Abs da EUROIMMUN, para a detecção de anticorpos de tipo IgG ou IgM. Neste teste, o antígeno é constituído por uma suspensão de *Treponema pallidum* (estirpe de Nichols) fixada em lâminas. Em caso de infecção por *Treponema pallidum*, com consequente produção de anticorpos a presença destes no soro do doente é evidenciada pela reacção antígeno-anticorpo específico, quando soro é colocado em contacto com o antígeno fixado na lâmina. A reacção é identificada ao microscópio de fluorescência, através da união de anticorpos anti-imunoglobulina M (anti-IgM) ou anti-imunoglobulina G (anti-IgG) humana, marcados com fluoresceína, que por sua vez se ligam ao complexo antígeno-anticorpo, e que resulta na visualização de espiroquetas fluorescentes de tonalidade esverdeada.

Na execução desta técnica foram seguidas as instruções da casa comercial.

Na primeira fase, procedeu-se a um pré-tratamento das amostras pela sua absorção com *Treponema phagedaemis* a fim de eliminar reactividade cruzada com anticorpos inespecíficos. Para tal misturou-se 12,5µl de amostra não diluída com 50µl de FTA-absorvente, obtendo-se uma diluição de 1:5, e agitou-se no vórtex durante 4 seg. Incubou-se à temperatura de 37°C, durante 30 min. Para a pesquisa de anticorpos do tipo IgM, realizou-se uma segunda imunoabsorção com o absorvente “RF Absorbent” EUROIMMUNE. Este reagente contém anticorpos anti-humanos de cabra, com alta afinidade para os anticorpos de tipo IgG presentes na amostra, os quais precipitam após a reacção ter tido lugar. Por outro lado, o factor reumatóide, quando presente, será absorvido pelo complexo IgG/IgG anti-humano prevenindo-se a falsa reactividade devido à eventual presença daquele factor. Neste passo, misturou-se 30µl de amostra previamente tratada com 30µl de absorvente de factor reumatóide (diluição final da amostra 1:10), colocou-se no vórtex durante 4 segundos e incubou-se 15 min. à temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 min. Para a pesquisa de anticorpos de tipo IgG, e para obter uma diluição final de 1:10, adicionou-se 25µl de amostra, tratada com 25µl de PBS Tween (tampão fosfato salino). As amostras absorvidas foram colocadas em contacto com o antígeno fixado na lâmina

durante 30 min., após o que os anticorpos não ligados foram lavados com tampão salino pH 7,2 (PBS) adicionado de Tween 20 a 92%. Após esta lavagem adicionou-se o conjugado anti-IgG ou anti-IgM conforme o tipo de anticorpos a evidenciar e efectuou-se nova incubação de 30 min. Por fim, as lâminas foram lavadas, cobertas com óleo de imersão e lamela, e foram observadas ao microscópio de fluorescência com uma objectiva de 40x.

Considerou-se como resultado reactivo positivo a observação de fluorescência evidente dos treponemas que cobriam a área de reacção na lâmina e como negativo, a sua ausência (figura 4).



**Figura 4.** Teste de Imunofluorescência indirecta. Exemplo de uma amostra positiva evidenciando a espiroqueta *Treponema pallidum* fluorescente.

#### **1.3.2.4 Teste westernblot**

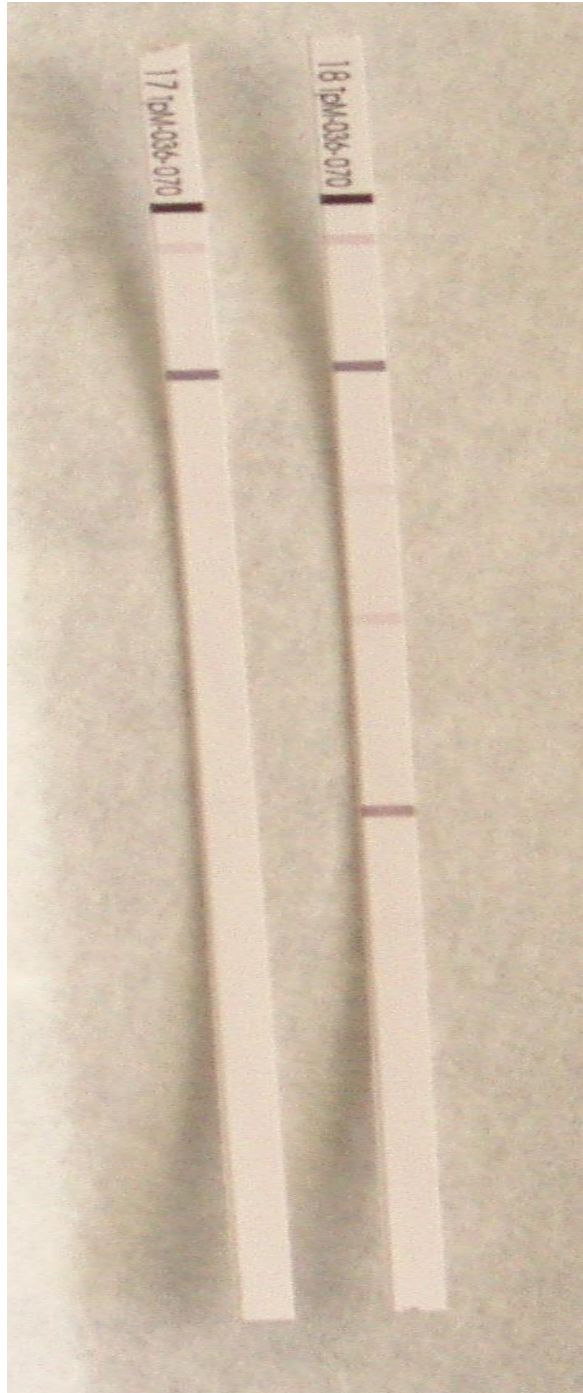
A pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM foi também efectuada por uma técnica de Westernblot comercializada, “*Treponema pallidum* LINE (recombinant) IgM Line Immunoblot” da Genzyme Virotech GmbH. Este tipo de teste utiliza tiras de membrana de nitrocelulose sensibilizadas com as proteínas TpN47; TmpA; TpN17 e TpN15 de *Treponema pallidum* (figura 5).

Para proceder à realização deste teste seguiu-se o protocolo fornecido pela casa comercial.

O teste foi efectuado à temperatura ambiente. Numa primeira etapa colocaram-se as tiras de membrana de nitrocelulose em placas limpas e de seguida pipetou-se 1,5ml de tampão de lavagem para cada uma das tiras, colocando as placas num agitador rotatório automático. Posteriormente foram colocados em contacto com as respectivas tiras 15µl de soro da amostra e 100µl de cut-off, controlo positivo e controlo negativo fornecidos pelo kit, e as placas ficaram a incubar durante 30 min. num agitador rotatório automático. Após esta incubação, aspirou-se cuidadosamente e por completo o líquido das placas, colocou-se 1,5ml de tampão de lavagem e incubou-se as placas nas condições anteriores durante 15 min., tendo-se no final aspirado todo o líquido. Adicionou-se então 1,5ml de conjugado a cada uma das tiras e procedeu-se à incubação durante 30 min. no agitador rotatório automático. Passado esse tempo, repetiu-se o passo de aspiração seguido de lavagem com 1,5ml de tampão de lavagem durante 15 min., para depois se aspirar todo o líquido, e efectuar outra lavagem com 1ml de água destilada durante 1 min. No final aspirou-se a totalidade do líquido das placas. Pipetou-se 1,5ml de solução de substrato para cada uma das placas e colocou-se as placas num agitador rotatório automático durante 10 a 13 min. Assim que se verificou uma alteração de cor nas tiras de membrana de nitrocelulose, aspirou-se todo o líquido das placas e procedeu-se a três últimos passos de lavagem com 1,5ml de água destilada. No final aspirou-se a água destilada presente nas placas e procedeu-se à leitura e interpretação das tiras de membrana de nitrocelulose.

Relativamente à análise dos resultados e com o intuito de interpretar os mesmos, a intensidade da proteína TpN47 presente no cut-off serviu como referência, de modo a proceder à comparação com as bandas das outras proteínas (TpN47; TmpA; TpN17; TpN15) presentes nas diversas amostras. Seguiram-se os critérios da casa comercial, atribuindo-se o valor 0 às bandas que apresentavam intensidade inferior à da banda referência; valor 1, às com a mesma intensidade; e valor 2 às com intensidade superior à da banda de referência. O resultado do teste foi considerado negativo quando a soma dos valores foi inferior a 2; duvidoso quando a soma correspondeu a 2, e positivo quando a soma dos valores foi superior a 2. Este valor positivo demonstrava que os anticorpos específicos de tipo IgM das amostras reagiam com os antigénios presentes nas tiras e formavam imunocomplexos, resultando visualmente num precipitado

antígeno/anticorpo de tom azul-violeta nas diferentes proteínas (TpN47; TmpA; TpN17; TpN15).



**Figura 5.** Teste Western-blot. Exemplo de duas tiras de membrana de nitrocelulose sensibilizadas com as proteínas TpN47; TmpA; TpN17 e TpN15 de *Treponema pallidum* (tira esquerda – exemplo de amostra negativa; tira direita – exemplo de amostra positiva).

### **1.3.3 Pesquisa de ADN de *Treponema pallidum***

A pesquisa de ADN de *Treponema pallidum*, nos diversos produtos biológicos, foi efectuada por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, uma delas designada PCR-Multiplex com a visualização dos produtos de amplificação em gel de agarose, sendo a outra uma técnica de PCR em tempo real, implementada e otimizada no laboratório de DST do IHMT.

#### **1.3.3.1 Extração de ADN total**

Para proceder à extração do ADN, utilizou-se o kit comercial “QIAamp<sup>R</sup> DNA Blood Mini Kit” da Quiagen, que visa a obtenção de uma purificação célere do material genético proveniente das amostras.

Este “kit” é constituído por colunas de eluição, proteinase K, tampões de lavagem (AW1 e AW2), tampão de lise (TAL) e tampão de eluição (TAE).

Procedeu-se de acordo com as instruções do fabricante, com excepção de se ter adicionado ADN de timo de vitela (10,5µg/µl sigma) e na fase de eluição, na qual se utilizou 80µl de TAE em vez dos 200µl recomendados.

Na primeira fase do procedimento pipetou-se 20µl de proteinase K no fundo de um tubo de microcentrífuga de 1,5ml, ao qual se adicionou 200µl de amostra e 200µl de TAL e homogeneizou-se no vórtex durante 15 seg. Esta mistura foi a incubar em banho seco 56°C, durante 30 min. Após esta incubação, centrifugou-se brevemente o tubo de 1,5ml de modo a remover as gotas de água que pudessem existir no interior da tampa. Adicionou-se 3µl de ADN de timo de vitela diluído a 1:10 e posteriormente acrescentou-se 200µl de etanol (96-100%) a cada amostra tendo-se misturado no vórtex durante 3-5 seg. Centrifugou-se brevemente o tubo de 1,5ml e deixou-se em repouso durante 5 min. Após esse tempo aplicou-se cuidadosamente a mistura à coluna (“Spin QIAamp”) previamente inserida num tubo colector de 2ml e centrifugou-se durante 1 min. a 8000 rpm (rotações por minuto). Posteriormente, colocou-se a coluna em tubo de recolha limpo, adicionou-se 500µl de AW1, sem molhar o bordo e voltou-se a centrifugar a 8000 rpm durante 1 min, após o que se efectuou uma segunda lavagem com 500µl de AW2 e centrifugação a 13000 rpm durante 3 min. Para remoção do

líquido residual colocou-se a coluna num novo tubo de recolha, centrifugou-se a 13000 rpm durante 1 min. e com a ajuda de uma micropipeta removeu-se o excesso de tampão. Na última fase do procedimento, colocou-se a coluna num tubo de microcentrífuga de 1,5ml limpo, abriu-se cuidadosamente e adicionou-se 80µl de TAE. Deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 5 min. e depois centrifugou-se a 13000 rpm durante 1 min. O ADN obtido foi dividido em alíquotas, uma para utilizar de imediato e outra congelada a -20°C para posterior utilização, se necessário.

Com o objectivo de ser utilizado como controlo positivo para as técnicas de PCR, este protocolo foi também utilizado para a extracção de ADN a partir de 200 µl de extracto testicular ( $5 \times 10^3$  treponemas/µl) de coelho infectado com *Treponema pallidum* (estirpe *Treponema pallidum* de Nichols).

### 1.3.3.2 Amplificação de ADN de *Treponema pallidum* – PCR-Multiplex

Para pesquisa de ADN de *Treponema pallidum* foi efectuada por uma técnica de PCR com a utilização simultânea de dois pares de *primers* com genes alvo de amplificação diferentes, na mesma mistura de reacção (PCR-Multiplex). A técnica baseou-se na de Orle et al. (1996), que descreveu o par de *primers* KO3A-F / KO4-R que amplifica um fragmento de 260 pb (pares de base) do gene de lipoproteína de 47 kDa, e em Liu et al. (2001), que descreveu o par de *primers* *polA*-F / *polA*-R que amplifica um fragmento de 378 pb do gene da enzima DNA polimerase I. As sequências oligonucleotídicas encontram-se descritas na tabela 1.

**Tabela 1.** Genes alvo, descrição dos *primers* e tamanho dos produtos de PCR amplificados, utilizados na técnica de PCR-Multiplex para a detecção de ADN de *Treponema pallidum*.

Genes alvo	<i>Primers</i>	Tamanho do produto de PCR amplificado
tp 47	KO3A-F 5'-GAAGTTTGTCCCAGT TGCGGTT-3'	260 pb
	KO4-R 5'-CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3'	
<i>pol A</i>	<i>polA</i> -F 5'-TGCGCGTGTGCGAATGGGTGGTC-3'	378 pb
	<i>polA</i> -R 5'-CACAGTGCTCAAAAACGCGTGCACG-3'	

Na preparação da mistura de reacção utilizou-se para um volume de 20µl, água bidestilada desionizada; tampão de reacção de PCR 1x [160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 M Tris-HCl, pH 8,3 e 0,1% Tween-20]; 0,4mM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs); 2,5mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 0,3mM dos *primers* *polA-R*, *polA-F*, *KO3A-F* e *KO4-R*, respectivamente; e 0,5U da enzima DNA polimerase Imolase da Bioline. A cada tubo adicionou-se 5µl de ADN correspondente a cada amostra, prefazendo um volume total de 25µl por cada tubo.

Em cada série de reacções de amplificação utilizou-se um controlo positivo constituído por ADN de *Treponema pallidum* e controlos negativos, nos quais foi adicionado água estéril em vez de ADN. Os controlos negativos foram processados um no início, outro no meio e outro no final de todo o processo.

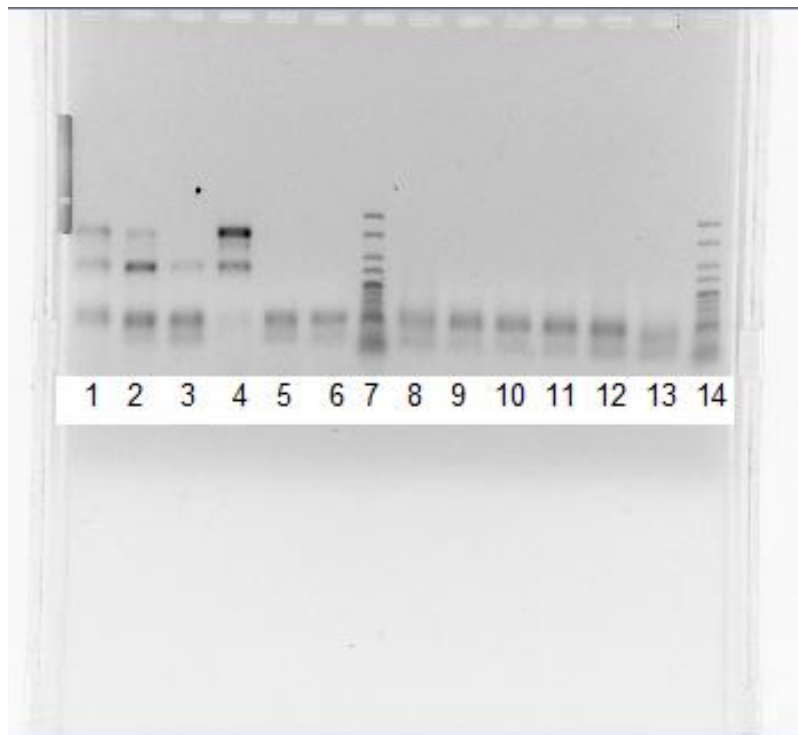
As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador Biometra Tpersonal com as seguintes condições de amplificação: um ciclo de activação da enzima a 95°C durante 5 min. seguido de 44 ciclos de amplificação consistindo em desnaturação a 95°C durante 30 seg., ligação dos *primers* às sequências alvo a 58°C durante 30 seg., extensão a 72°C durante 30 seg. Aos ciclos seguiu-se etapa final de extensão a 72°C por um período de 15 min.

Os produtos das reacções de amplificação foram visualizados por electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x, ao qual se adicionou 0,5µg/ml de brometo de etídio. A 10µl dos produtos de amplificação adicionou-se 3µl de tampão de amostra (solução saturada de sacarose com azul de bromofenol) e aplicou-se nos poços do gel. Este foi submetido a um campo eléctrico de 100 V, 50 mA, durante 1 hora em tampão TBE 0,5% no aparelho “Electrophoresis Power Supply (EPS) 301” da Electrophoresis Apparatus. Em todos os géis de agarose estudados, aplicou-se 2,5µl de marcador de massa molecular de “2 Kb HyperLadder IV” da Bioline, tendo como objectivo confirmar a massa molecular dos produtos amplificados

A sua visualização foi efectuada por exposição à luz ultra-violeta no transiluminador GelDOC XR da Bio-Rad.

Para proceder à leitura e interpretação dos resultados, as imagens dos produtos de amplificação da PCR foram captadas e fotografadas com recurso ao programa “Quantity One 1-D Analysis Software” (versão 4.6.1) da Bio-Rad.

A presença de infecção por *Treponema pallidum* (resultado positivo) foi verificada pela visualização de uma banda de 260 pb e/ou 378 pb, sendo a ausência de qualquer delas considerada como resultado negativo (figura 6).



**Figura 6.** Visualização, após electroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela técnica de PCR-Multiplex. (7 e 14 – marcador de peso molecular; 6 e 13 – controlo negativo; 4 – controlo positivo; 1 e 2 e 3 – amostras positivas; 5, 8-12 – amostras negativas).

Todas as amostras de parturientes, grávidas e recém-nascidos com serologia reactiva para a pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum* foram estudadas por esta técnica, assim como as amostras provenientes de doentes em diferentes estádios de infecção e de indivíduos considerados como não tendo infecção sífilítica que seriam utilizados na validação da técnica de PCR-TR.

### 1.3.3.3 Técnica de PCR em tempo real

Com o objectivo de dispor de uma forma mais específica e com maior sensibilidade para a pesquisa de ADN de *Treponema pallidum* foi optimizada uma

técnica de PCR-TR, com dois pares de *primers* (TrepU/TrepA e *polA-S/polA-rev* que têm como alvo de amplificação o gene da enzima DNA polimerase I) e respectivas sondas TaqMan (Trep-TM e *polA-TM*) fornecidas pela TIB MOLBIOL (Quilaban), utilizando o ADN do controlo positivo e a pré-mix SensiMix TM Probe kit – BIOLINE. As sequências oligonucleotídicas dos *primers* e sondas estão descritas nas tabela 2. A pré-mix utilizada contém todos os reagentes necessários a uma técnica de amplificação em tempo real, inclui uma enzima taq polimerase de tipo “hot start”, que activa a temperaturas elevadas.

Com base nas recomendações do fabricante da pré-mix foram experimentadas variações nas concentrações de *primers* de 0,4µM a 1µM e das sondas de 0,1 e 0,2µM. As diversas concentrações foram experimentadas com variação da temperatura de ligação dos *primers* ao gene alvo de 60°C a 63°C.

**Tabela 2.** *Primers* e sondas, utilizados na técnica de PCR-TR para a detecção de ADN de *Treponema pallidum*.

<i>Primers</i> e sondas	Sequências oligonucleotídicas
Trep U	5′- GCACAGAACAGCATGGGGTAT -3′ (954-931)
Trep A	5′- TTATGCATAACAAGTGTGAGCGT-3′ (836-856)
Trep-TM	6FAM-CAAAGACGTCGAAGCTGGTGCATGAC—TMR (920-895)
<i>polA-s</i>	5′- TTATTGATTGCGCGTGTG-3′ (1752-1769)
<i>polA-rev</i>	5′- CGGTATGAAGAGAAACGTCC -3′ (1910-1891)
<i>polA-TM</i>	6FAM-CGTCTGGTCGGATTTTCGATCTGCTTTC—BBQ (1826-1853)

A reacção de PCR foi realizada com um volume final de 14,4µl de mistura de reacção, consistindo em água bidestilada desionizada, um par de *primers* e respectiva sonda nas diferentes concentrações a estudar e mistura de reacção comercializada SensiMix Probe 2x da Boline adicionado por último de controlo positivo ou controlo negativo de água.

A amplificação foi efectuada no termociclador Rotor-Gene 3000 da Corbett Robotics, o qual é constituído por quatro canais de emissão de luz que permitem

detectar várias sequências alvo numa mesma reacção de amplificação. Para proceder à identificação dos produtos amplificados, esta ocorre mediante a intensidade de fluorescência nos tubos de reacção, que é detectada nos respectivos canais.

As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de 10 min. a 95°C para activação da enzima, seguido de 40 ciclos de 60 seg. com as variações de temperatura de ligação, a estudar.

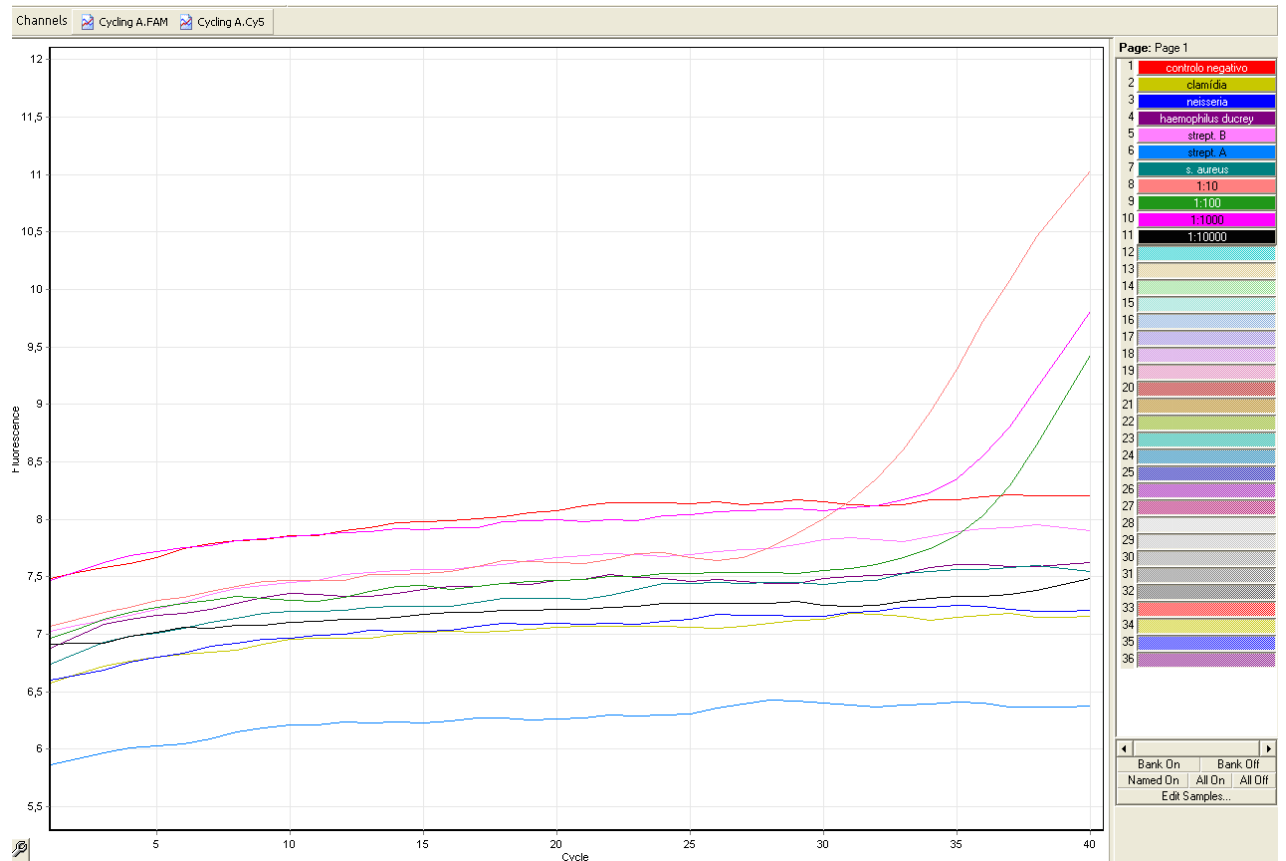
Uma vez obtidas as melhores condições de amplificação relativamente ao tipo de *primers* e sondas, concentrações dos mesmos e temperatura de ligação dos *primers* à sequência alvo, efectuou-se o estudo da sensibilidade e especificidade desta técnica.

A sensibilidade foi estudada por diluições seriadas do controlo positivo e a especificidade pela utilização de ADN extraído dos seguintes microrganismos: *Chlamydia trachomatis*; *Haemophilus ducreyi*; *Leptospira sp*; *Borrelia burgdorferi*; *Streptococcus A*; *Streptococcus B*; *Staphylococcus aureus*; e Herpes Simplex.

Com o intuito de validar a técnica foram estudadas por esta técnica amostras de doentes em diferentes estádios de sífilis e de indivíduos sem infecção por *Treponema pallidum*. As amostras provenientes de parturientes, grávidas e recém-nascidos com resultados reactivos pelas técnicas serológicas foram também estudadas por esta técnica.

A visualização da reacção de amplificação observou-se em tempo real no computador acoplado ao termociclador Rotor Gene 3000 e os resultados foram visualizados num gráfico.

Com base nos controlos negativos, obteve-se o limite (*threshold*) de um resultado negativo, e do controlo positivo uma curva de amplificação. Cada amostra clínica foi considerada positiva para a pesquisa de *Treponema pallidum* quando se verificou a presença de uma curva de amplificação superior ao limite (*threshold*), e uma amostra clínica foi considerada negativa para a pesquisa de *Treponema pallidum* quando não se presenciou sinal de amplificação, o que correspondia à inexistência de curva de amplificação no gráfico (figura 7).



**Figura 7.** Gráfico de PCR-TR mostrando as diferentes curvas de amplificação (1ª curva – controlo positivo de Tp 1:10; 2ª curva – controlo positivo de Tp 1:1000; 3ª curva – controlo positivo de Tp 1:100; 4ª curva – controlo negativo; restantes curvas – correspondem aos seguintes microrganismos: *Streptococcus B*; *Haemophilus ducrey*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus A*; *Chlamydia trachomatis*; *Leptospira sp.*).

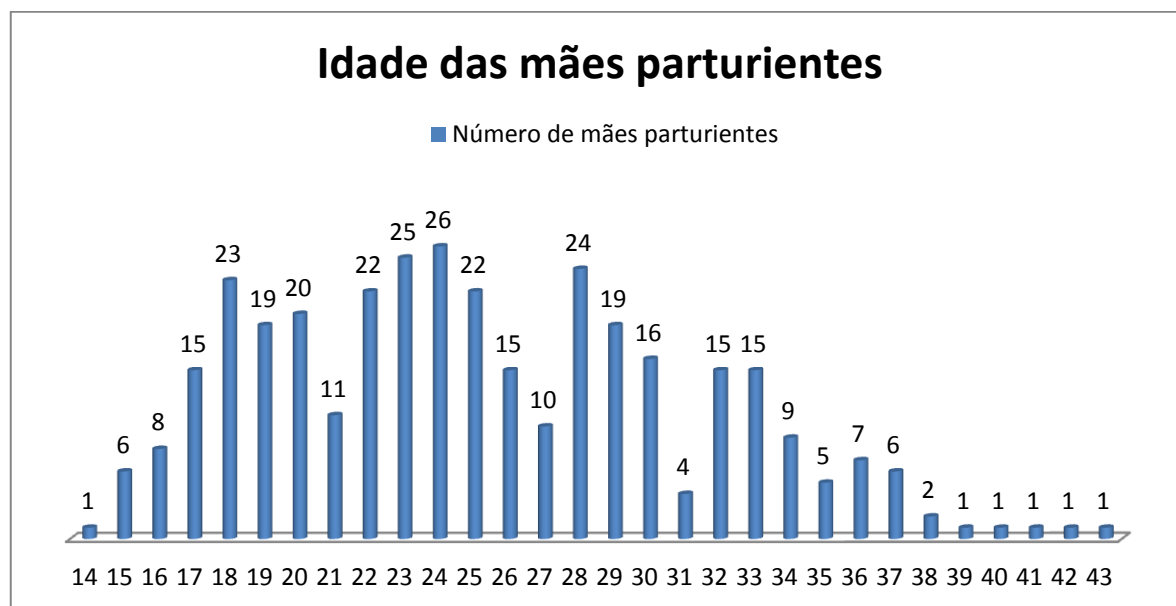
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. Caracterização da população

De um total de 728 amostras de soro provenientes de Angola, passíveis de serem analisadas (mães parturientes e respectivos recém-nascidos), apenas foram estudadas as 364 amostras de mães parturientes e 18 amostras dos recém-nascidos das parturientes com pelo menos um teste serológico RPR, TPHA, e/ou EIA reactivo.

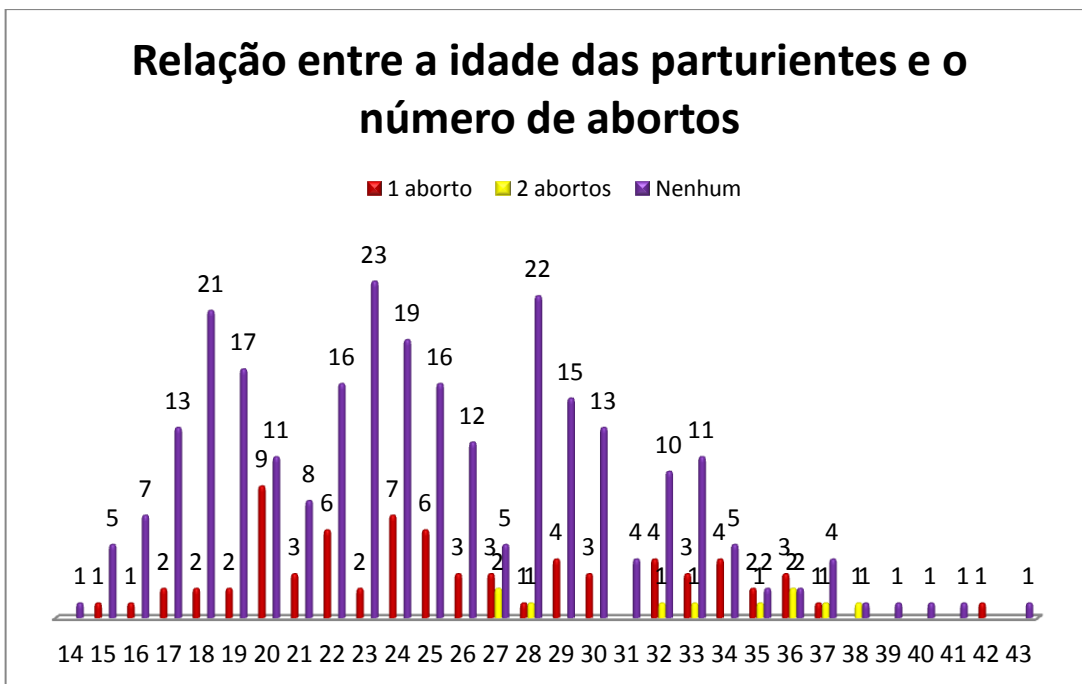
A população de estudo ficou completa com a inclusão de 135 amostras de grávidas e recém-nascidos com suspeita de infecção, provenientes da Maternidade Alfredo da Costa e do Hospital São Francisco Xavier em Lisboa, resultando numa população total de estudo constituída por 517 amostras.

Nas mães parturientes o parâmetro idade foi obtida em 350, as quais tinham entre os 14 e os 43 anos de idade, com uma média da idade de 25 anos e uma moda de 24 anos (26 das 350 parturientes) (figura 8).



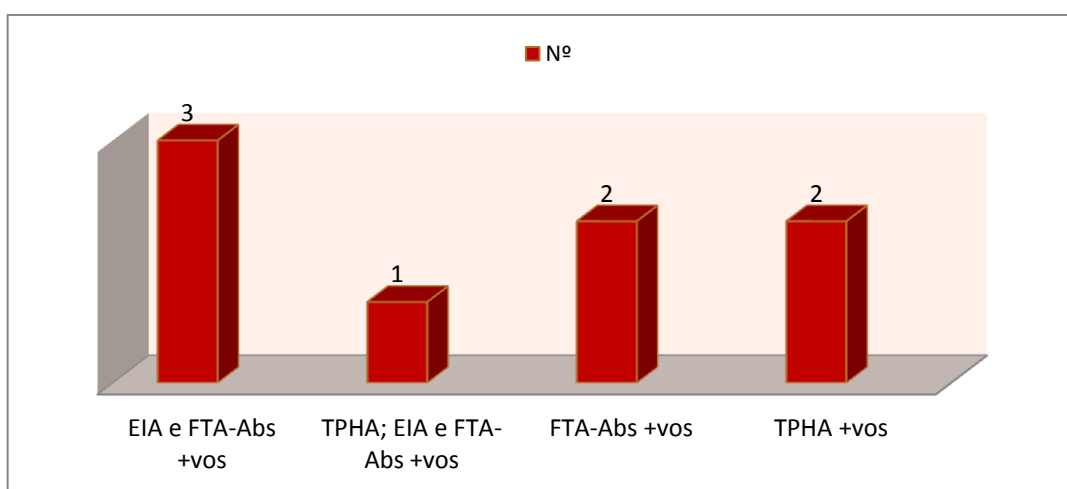
**Figura 8.** Idade das mães parturientes.

Nesta população de 350 parturientes, registaram-se 93 abortos, sendo que as mães que apresentaram o maior número de abortos situavam-se na faixa etária dos 20 anos (9 dos 93 abortos) (figura 9).



**Figura 9.** Relação entre a idade das parturientes e o número de abortos.

Das parturientes com episódios de aborto no passado verificou-se que apenas oito apresentaram reactividade serológica em um ou mais testes serológicos (TPHA; EIA; e FTA-Abs): em um caso com os três testes; em três casos com os testes EIA e FTA-Abs e em quatro casos apenas com um teste serológico (dois com o teste FTA-Abs e outras dois com o teste TPHA) (figura 10).



**Figura 10.** Relação entre o número de mães parturientes com registo de aborto *versus* resultado reactivo num dos três testes (TPHA; EIA e FTA-Abs).

De referir que, com a disparidade de resultados verificados, não se pode extrapolar nenhuma ilação entre as mães parturientes com registo de aborto e a reactividade aos testes efectuados.

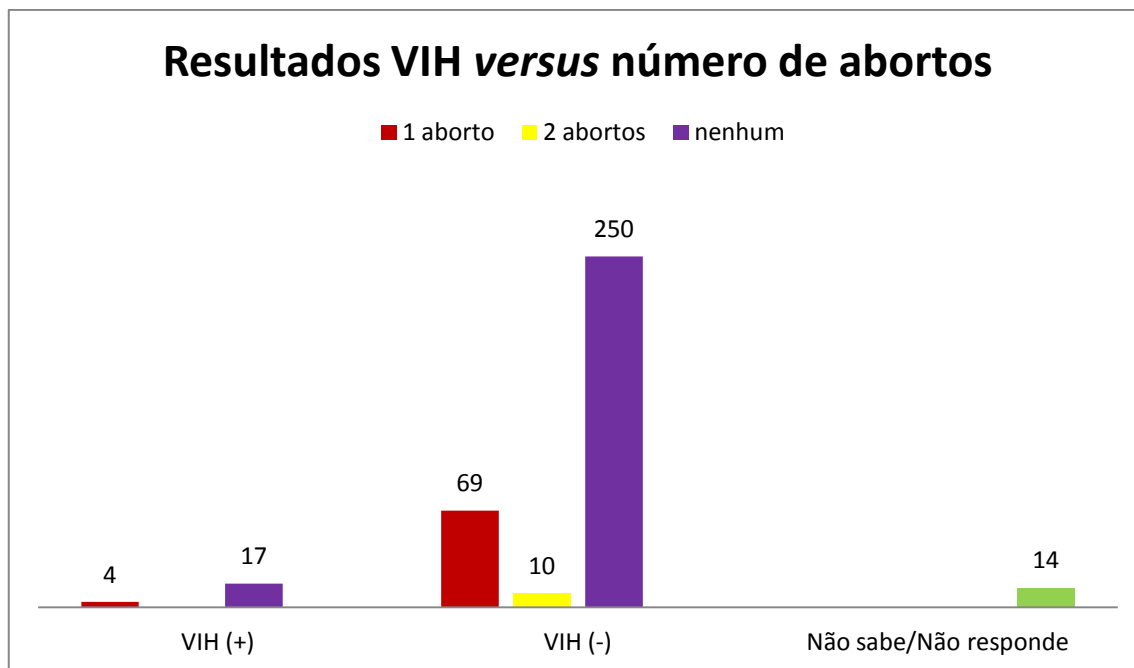
Relativamente à infecção pelo VIH foi possível obter informação em 350 parturientes, sendo 21 seropositivas (6%), 329 seronegativas (94%) e 14 das 364 parturientes não sabiam ou não responderam (figura 11).



**Figura 11.** Relação das parturientes com a presença de infecção por VIH.

Verificou-se que entre as infectadas pelo VIH quatro tiveram um aborto, enquanto que as restantes 17 mães não tiveram qualquer aborto. Relativamente às parturientes não infectadas pelo VIH: 69 tiveram um aborto; dez tiveram dois abortos; e 250 não tiveram registo de qualquer aborto. (figura 12).

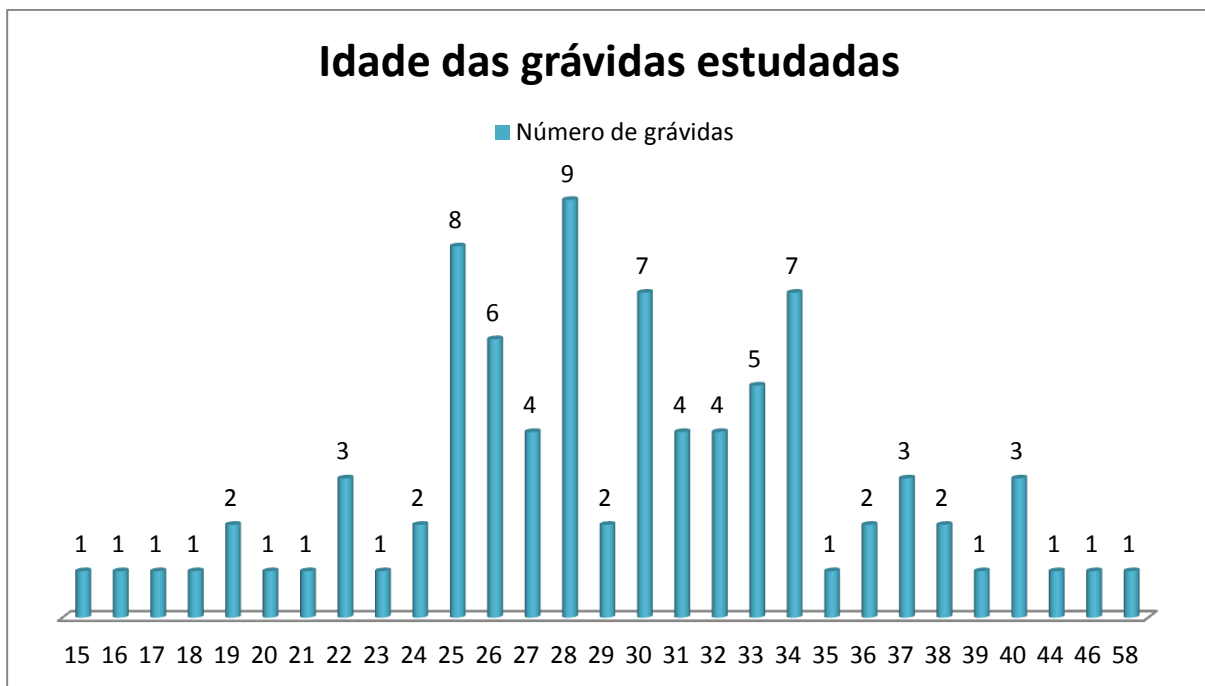
Quanto a uma possível relação entre a presença de infecção pelo VIH e a suspeita de sífilis, esta apenas se verificou numa parturiente, a qual apresentou reactividade nos quatro testes efectuados (RPR; TPHA; EIA e FTA-Abs).



**Figura 12.** Resultados da relação entre o número de abortos e a seropositividade ou não das mães parturientes (Legenda: vermelho – um aborto; amarelo – dois abortos; roxo – nenhum aborto; laranja – nº parturientes que não sabiam ou não quiseram responder).

Relativamente às amostras provenientes dos hospitais de Lisboa, 86 pertenciam a mulheres grávidas assintomáticas com idades entre os 15 e os 58 anos de idade, correspondendo a uma média da idade de 30 anos e uma moda de 28 anos (9 das 86 parturientes) (figura 13).

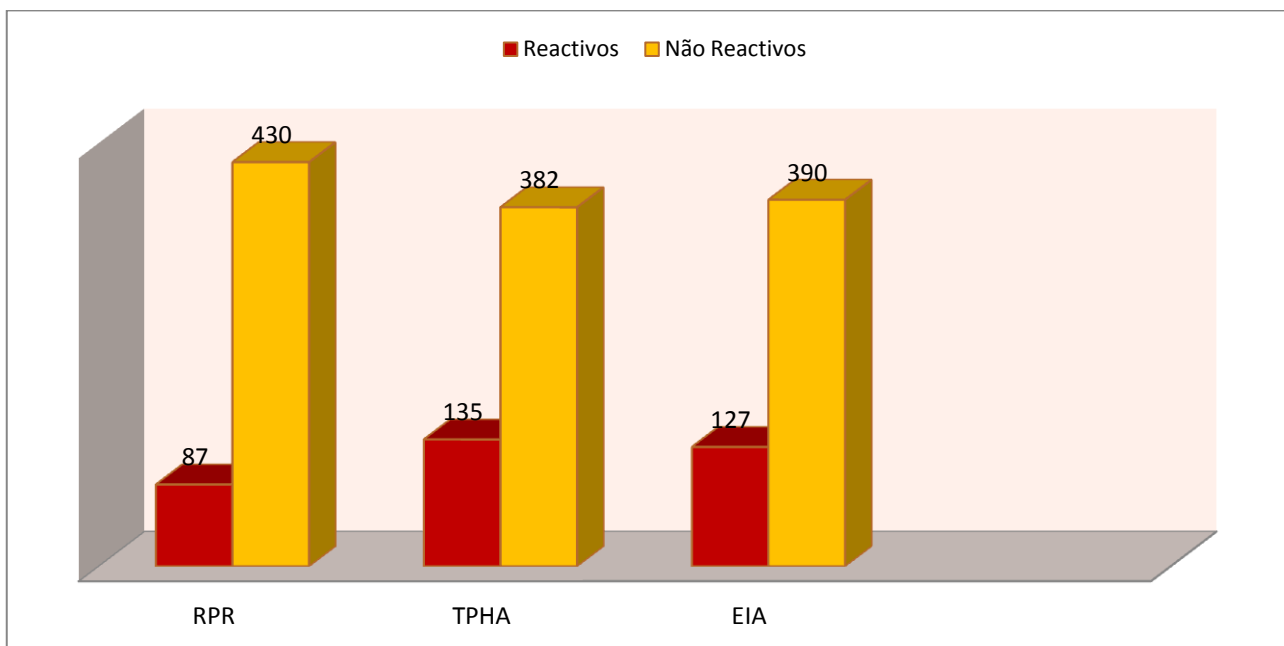
Relativamente à infecção pelo VIH foi possível obter informação nas 86 grávidas, sendo 2 infectadas (2,33%) e 84 não infectadas (97,67%).



**Figura 13.** Idade das grávidas estudadas.

## 2. Testes serológicos

Na globalidade dos soros estudados (517) obtiveram-se os seguintes resultados: o RPR foi reactivo em 87/517 (16,83%) e não reactivo em 430/517 (83,17%); o TPHA foi reactivo em 135/517 (26,11%) e não reactivo em 382/517 (73,89%); o EIA foi reactivo em 127/517 (24,56%) e não reactivo em 390/517 (75,44%) (figura 14).



**Figura 14.** Reactividade dos soros estudados obtida com os testes RPR, TPHA e EIA.

Comparados os três tipos de testes efectuados, verificou-se que 361/517 (69,83%) das amostras não apresentaram reactividade em nenhuma das técnicas utilizadas, tendo esta existido num ou em ambos os testes, em 156/517 (30,17%). É de salientar que 23 amostras foram reactivas apenas por uma técnica: 9/517 (1,74%) pela técnica de RPR; 9/517 (1,74%) pela técnica de TPHA; e 5/517 (0,97%) com a técnica de EIA.

Após o estudo dos 517 soros pelas técnicas de RPR, TPHA e EIA, nos soros reactivos em todos os testes ou com resultados discrepantes (156), foi executado o teste específico FTA-Abs, para pesquisa de anticorpos de tipo IgG (FTA-Abs-G). Relativamente aos resultados obtidos, em 135 soros a reactividade por esta técnica confirmou a obtida em uma ou mais das outras. Em 21 casos a técnica foi não reactiva.

Destes provavelmente 11 referem-se a reações de falsa positividade do teste RPR (1,2,8,11,12,21,22,27,28,32,41,49,55,58,59,62,68,70,74), sete resultaram de reações de falsa positividade do teste TPHA (8,11,23,58,68), e um de falsa positividade do teste EIA (3,11,23,41,62). Enquanto que os restantes dois se relacionam com reações de falsa negatividade do teste FTA-Abs (23,32), já que foram reactivos pelos outros dois testes treponémicos.

## 2.1 Comparação dos testes não treponémicos

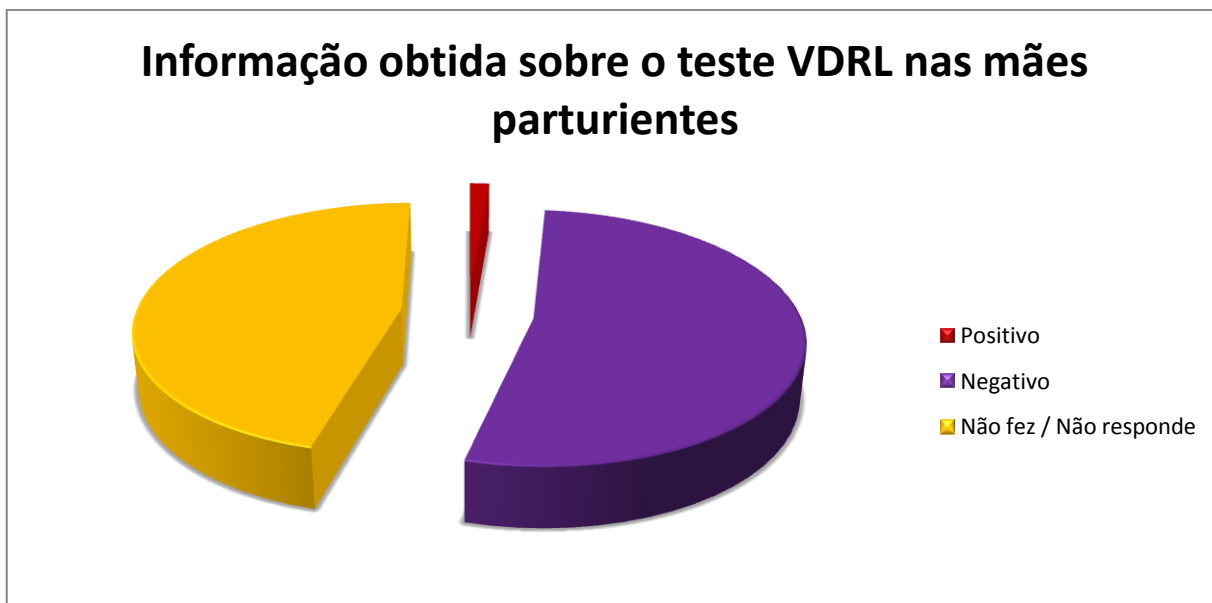
Em 197/364 das mães parturientes foi possível obter o resultado do teste VDRL realizado em Angola tendo-se verificado ser reactivo em cinco casos e negativo em 197 (figura 15).

Procedeu-se a comparação dos resultados obtidos entre o teste VDRL efectuado em Angola, e o teste RPR efectuado em Portugal no laboratório de DST (Tabela 3).

Para uma totalidade de 197 soros, o RPR foi reactivo em 3/197 (1,52%) e não reactivo em 194/197 (98,45%); no entanto, o VDRL apresentou reactividade em 5/197 (2,54%) não o tendo demonstrado em 192/197 (97,46%). Relativamente aos dois casos discrepantes, muito provavelmente referem-se a reações de falsa positividade do teste VDRL (2,12,22,24,27,28,55,59,62,68,78), pois estes dois soros de mães parturientes, não obtiveram reactividade em nenhum dos testes específicos efectuados. Com base nestes dados verificou-se que o VDRL apresenta uma reactividade semelhante à técnica de RPR, com uma taxa de concordância de 98,9%, o que parece demonstrar que os dois testes são idênticos (9).

**Tabela 3.** Comparação dos resultados obtidos com os testes VDRL e RPR.

		RPR		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
VDRL	Reactivo	3	2	5
	Não Reactivo	0	192	192
Total		3	194	197



**Figura 15.** Informação obtida sobre o teste VDRL nas mães parturientes.

## 2.2 Comparação do teste não treponémico com os testes treponémicos

Na comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e TPHA (Tabela 4) verificou-se uma taxa de concordância de 90,72% (469/517). Relativamente aos 48 casos discrepantes, cinco referem-se a reações de falsa positividade do teste TPHA (8,11,23,58,68), pois estas amostras não obtiveram qualquer reactividade nos outros testes serológicos efectuados enquanto que os restantes 43 casos podem eventualmente corresponder a reações de falsa negatividade do teste RPR (23,27,28,32,36,41,55,58,59), uma vez que estas amostras foram reactivas com os testes de imunofluorescência indirecta e imunoenzimático.

**Tabela 4.** Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e TPHA.

		TPHA		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
RPR	Reactivo	87	0	87
	Não Reactivo	48	382	430
Total		135	382	517

A comparação dos testes RPR e EIA (Tabela 5) resultou numa taxa de concordância de 92,26% (477/517). Relativamente aos 40 casos discrepantes, muito provavelmente um refere-se a reação de falsa positividade do teste EIA (3,11,23,41,62), pois esta amostra não obteve qualquer reactividade nos outros testes serológicos efectuados; 39 eventualmente correspondem a reações de falsa negatividade do teste RPR (23,27,28,32,36,41,55,58,59), uma vez que estas amostras obtiveram reactividade nos testes de imunofluorescência indirecta e TPFA.

**Tabela 5.** Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e EIA.

		EIA		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
RPR	Reactivo	87	0	87
	Não Reactivo	40	390	430
	Total	127	390	517

### 2.3 Comparação dos testes treponémicos

Na comparação do teste EIA com o teste TPFA (Tabela 6) o primeiro apresentou uma sensibilidade de 94,07%, e uma especificidade de 100% com uma taxa de concordância de 98,45% (509/517).

**Tabela 6.** Comparação dos resultados obtidos com os testes EIA e TPFA.

		TPFA		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
EIA	Reactivo	127	0	127
	Não Reactivo	8	382	390
	Total	135	382	517

Sensibilidade (127/135) – 94,07%

Especificidade (382/382) – 100%

Taxa de concordância (509/517) – 98,45%

Por outro lado, da comparação do teste TPHA com o teste EIA (Tabela 7) obteve-se uma sensibilidade de 100%, com uma especificidade de 97,95% e uma taxa de concordância de 98,45% (509/517)

**Tabela 7.** Comparação dos resultados obtidos com os testes TPHA e EIA.

		EIA		
TPHA		Reactivo	Não Reactivo	Total
	Reactivo	127	8	135
	Não Reactivo	0	382	382
Total		127	390	517

Sensibilidade (127/127) – 100%

Especificidade (382/390) – 97,95%

Taxa de concordância (509/517) – 98,45%

Relativamente aos oito casos discrepantes, seis muito provavelmente referem-se a reações de falsa positividade do teste TPHA (8,11,23,58,68), pois estas amostras não obtiveram qualquer reactividade nos outros testes serológicos efectuados; dois eventualmente correspondem a reações de falsa negatividade do teste TPHA (23,62), uma vez que estas amostras obtiveram reactividade no teste de imunofluorescência indirecta e no teste de RPR.

Na avaliação dos resultados, demonstra-se que a reactividade do teste TPHA em relação ao EIA foi muito semelhante, embora o teste TPHA tenha apresentado uma maior sensibilidade, isso parece ser devido à presença de resultados reações de falsa negatividade por esse teste, contudo a taxa de concordância foi semelhante.

No que diz respeito à especificidade, esta foi praticamente igual no EIA (100%) e no TPHA (97,95%), sendo estes valores muito próximos ao descrito noutros estudos onde a especificidade para ambos os testes situava-se entre os 93% e os 100%. (9,11, 29, 32, 62)

#### **2.4 Pesquisa de anticorpos – *Treponema pallidum* – anti IgM**

A pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM foi efectuada nos 33 soros em que o título de RPR foi igual ou superior a 1:4 e existiu quantidade suficiente de

amostra para ser estudada pelas técnicas de imunofluorescência indirecta (FTA-Abs-M) e de western-blot (WB-M).

Quanto aos resultados obtidos por estas duas técnicas, o teste FTA-Abs-IgM demonstrou reactividade em 3/33 (9,09%), e não a exibiu em 30/33 (90,91%), enquanto que a técnica de western-blot-M, apresentou reactividade em 18/33 (54,55%), e não a teve em 15/33 (45,45%). A taxa de concordância entre os dois testes foi de 54,55%.

Relativamente à especificidade, o teste westernblot apresentou um valor de 50%, valor inferior ao descrito noutros estudos onde a especificidade se situava entre os 67% e os 100%. (31, 32, 70, 74)

Na comparação das duas técnicas, foi possível verificar que os resultados obtidos são pouco semelhantes, tendo o método westernblot apresentado uma maior sensibilidade (Tabela 8).

**Tabela 8.** Comparação dos resultados obtidos com os testes westernblot e FTA-Abs IgM.

		FTA-Abs IgM		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
Westernblot	Reactivo	3	15	18
	Não Reactivo	0	15	15
	Total	3	30	33

Sensibilidade (3/3) – 100%

Especificidade (15/30) – 50%

Taxa de concordância (18/33) – 54,55%

Em 15 casos não houve concordância nos resultados obtidos entre as duas técnicas, que muito provavelmente referem-se a reações de falsa negatividade da técnica de FTA-Abs IgM (23,32,64), uma vez que estes 15 soros foram reactivos em todos os outros testes serológicos efectuados (RPR, TPHA e EIA), e tratando-se de soros provenientes de doentes com suspeita clínica de sífilis, uma melhor avaliação do significado deste resultado poderia ser obtida caso tivesse sido possível o isolamento de *Treponema pallidum*.

Dos 33 casos, em apenas um (soro correspondente a um recém-nascido) é plausível avançar com a suspeita de diagnóstico de sífilis congénita, uma vez que este

soro apresentou reactividade em todos os testes serológicos efectuados, incluindo o teste western-blot, mas como não foi positivo no teste de imunofluorescência indirecta de tipo IgM e não tendo sido possível o isolamento de *Treponema pallidum*, é incerto avançar com um diagnóstico absolutamente correcto e preciso.

### 3. Testes serológicos – padrão de infecção

Realizados os estudos de comparação dos vários testes serológicos efectuados no universo dos 517 soros, analisaram-se de seguida os diversos padrões serológicos obtidos, com o intuito de inferir um possível padrão de infecção dos indivíduos. De referir também, que o acesso à história clínica e sexual dos mesmos, informações essas a que não tivemos acesso, é de extrema importância para o diagnóstico, uma vez que este deve fundamentar-se na relação entre os dados clínicos e os resultados laboratoriais.

A variedade de combinações serológicas permitiu classificar os indivíduos incluídos neste estudo em 11 dos 16 padrões possíveis quando se realizaram três testes específicos e um teste não específico para a pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*. A leitura dos resultados, indica que 75/517 (14,51%) obtiveram reactividade em todos os testes efectuados; 69/517 (13,35%) apresentaram reactividade somente nos testes treponémicos; 47/517 (9,10%) exibiram reactividade nos testes TPHA, EIA e FTA-Abs; 7/517 (1,35%) foram reactivos apenas no teste TPHA; 5/517 (0,97%) demonstraram reactividade nos testes EIA e FTA-Abs; 5/517 (0,97%) exibiram reactividade somente no teste FTA-Abs; 2/517 (0,39%) foram reactivos nos testes TPHA e EIA; 2/517 (0,97%) demonstraram reactividade nos testes TPHA e FTA-Abs; 11/517 (2,13%) tiveram reactividade apenas no teste não treponémico RPR; 1/517 (0,19%) foi somente reactivo nos testes RPR, TPHA e FTA-Abs; 1/517 (0,19%) foi apenas reactivo para o teste EIA; e 361/517 (69,83%) não apresentaram reactividade em nenhum dos testes (Tabela 9).

**Tabela 9.** Número de casos de acordo com as diferentes combinações serológicas possíveis com os quatro tipos de testes utilizados neste estudo.

Testes serológicos				
RPR	TPHA	EIA	FTA-Abs-G	Nº casos
R	NR	NR	NR	11
NR	NR	NR	R	5
NR	R	NR	NR	7
NR	R	R	R	47
NR	R	R	NR	2
NR	NR	R	R	5
R	R	R	R	75
NR	NR	R	NR	1
NR	NR	NR	-	361
NR	R	NR	R	2
R	R	NR	R	1
R	R	R	NR	0
R	NR	R	R	0
R	R	NR	NR	0
R	NR	R	NR	0
R	NR	NR	R	0
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo				

Os 75 casos em que todos os testes efectuados foram reactivos, 74 corresponderão à partida, a indivíduos com sífilis activa e portanto não tratada, podendo ser sífilis primária, secundária ou latente, considerando que todos os testes deverão ser reactivos em qualquer destas fases da doença (4,59); e um corresponderá em princípio, a recém-nascido com sífilis congénita (36). Analisando os títulos, tanto do RPR, como do TPHA, pensa-se que 51/57 sejam casos de sífilis primária, pois os títulos são relativamente baixos (9), oscilando entre 1:2 e 1:16 no caso do RPR e entre 1:80 e 1:20480 no caso do TPHA. Contudo, as diluições de menor valor poderão também corresponder a sífilis tratada, não tendo decorrido tempo suficiente para deixar de existir reactividade nos soros desses doentes (4). Por sua vez, 6/57 poderão corresponder a

casos de sífilis primária ou secundária com maior probabilidade para esta última hipótese, visto os títulos do RPR serem elevados (4), rondando estes entre 1:32 e 1:512.

No caso dos 69 indivíduos em que o teste não treponémico foi não reactivo e os testes treponémicos reactivos, o mais provável é corresponderem a casos de sífilis tratada (4,59). Tal situação assenta no facto da maior parte dos testes não treponémicos acabarem por se tornar não reactivos um ano após terapêutica correcta da sífilis primária, e após dois anos nos casos de sífilis secundária (9). Muitos destes indivíduos não se recordam de terem tido sífilis e de terem sido tratados, pois a sua lesão passou despercebida e curou devido à antibioterapia administrada para outra infecção que não a sífilis (9). Relativamente aos testes treponémicos, estes podem permanecer reactivos durante toda a vida, mesmo após a administração de uma terapêutica adequada (4,9,10).

Em sete casos, o teste TPHA foi reactivo e os restantes testes foram não reactivos, que poderão resultar de reacções de falsa positividade deste teste específico. Habitualmente, no teste TPHA este tipo de resultados são inferiores a 1%, podendo ocorrer em doentes com mononucleose infecciosa, com doenças de colagénio, lepra e em indivíduos toxicodependentes (9). Visto que a sífilis pode coexistir com estas patologias a distinção dos resultados pode tornar-se bastante difícil, embora em casos raros.

Destacaram-se outros três casos em que o teste FTA-Abs foi não reactivo e os restantes testes efectuados foram reactivos, levando a crer que os resultados serão reacções de falsa negatividade do teste FTA-Abs. Tanto no caso do TPHA como do FTA-Abs, as reacções de falsa negatividade podem dever-se a um erro laboratorial relacionado com a pipetagem, com os reagentes ou mesmo com a microplaca no caso do TPHA ou com a lâmina no caso do FTA-Abs (9). Outra hipótese que pode levar a estes resultados, está relacionada com a descida de títulos pós-terapêutica, pois as titulações dos outros testes foram extremamente baixas. As doenças do sistema conjuntivo, doentes com anemia hemolítica auto-imune e gravidez, podem também originar resultados correspondentes a reacções de falsa positividade para o teste FTA-Abs (9).

Em 11 amostras o teste não treponémico RPR foi reactivo e os restantes testes treponémicos foram não reactivos, o que resulta numa taxa de falsa positividade de 2,13%, o que não está de acordo com a taxa de incidência de falsa reactividade na população em geral que é cerca de 1% (9). Geralmente este tipo de resultado

corresponde a uma reacção de falsa reactividade por parte do teste não treponémico, sendo por isso aqueles casos considerados como reacções de falsa positividade, uma vez que as diluições do RPR são de 1:8, correspondendo a um título “borderline” que tem sempre que ser confirmado (4).

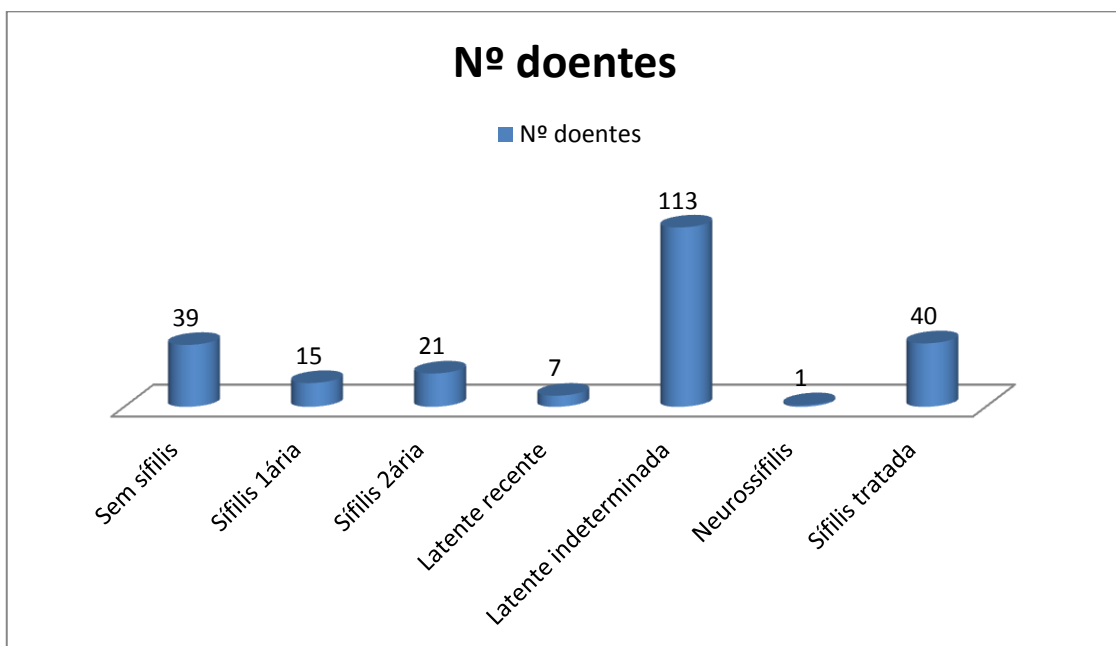
Os restantes 361 indivíduos em que os respectivos soros foram não reactivos para todos os testes, foram considerados como nunca tendo tido sífilis.

No que diz respeito à população avaliada com base nos quatro tipos de testes serológicos efectuados, verifica-se que um terço das grávidas e recém-nascidos são os que têm, pelo menos um dos testes reactivo (156). Provavelmente deve-se ao facto de serem indivíduos com suspeita de sífilis. Os restantes indivíduos, em que os quatro tipos de testes efectuados foram todos não reactivos, pertencem na sua vasta maioria ao grupo da maternidade Lucrecia Paim de Angola, visto que foi apenas um rastreio efectuado com o intuito de se encontrar indivíduos com suspeita de sífilis congénita.

#### 4. Amplificação de ADN de *Treponema pallidum*

Na implementação e optimização da técnica de PCR em tempo real foi demonstrado que as melhores condições de amplificação foram obtidas com as concentrações finais para os *primers* de 0,4  $\mu\text{M}$  e para as sondas de 0,2  $\mu\text{M}$  a uma temperatura de ligação dos *primers* à sequência alvo de 62°C. Não foi observada qualquer amplificação aquando do estudo por esta técnica do painel de microrganismos referidos em 1.3.3.3.

Aos 236 indivíduos incluídos nesta parte do estudo foi diagnosticada: sífilis primária em 15; sífilis secundária em 21; sífilis latente recente em sete; sífilis latente indeterminada em 113; e neurosífilis em um. Dos restantes 79 indivíduos, 39 não apresentavam história clínica, sintomas ou sinais compatíveis com diagnóstico de sífilis nem reactividade serológica sendo considerados como não possuindo infecção a *Treponema pallidum*, enquanto que 40 por terem efectuado terapêutica para sífilis e não apresentarem sintomas ou sinais, foram considerados como sífilis tratada (figura 16).

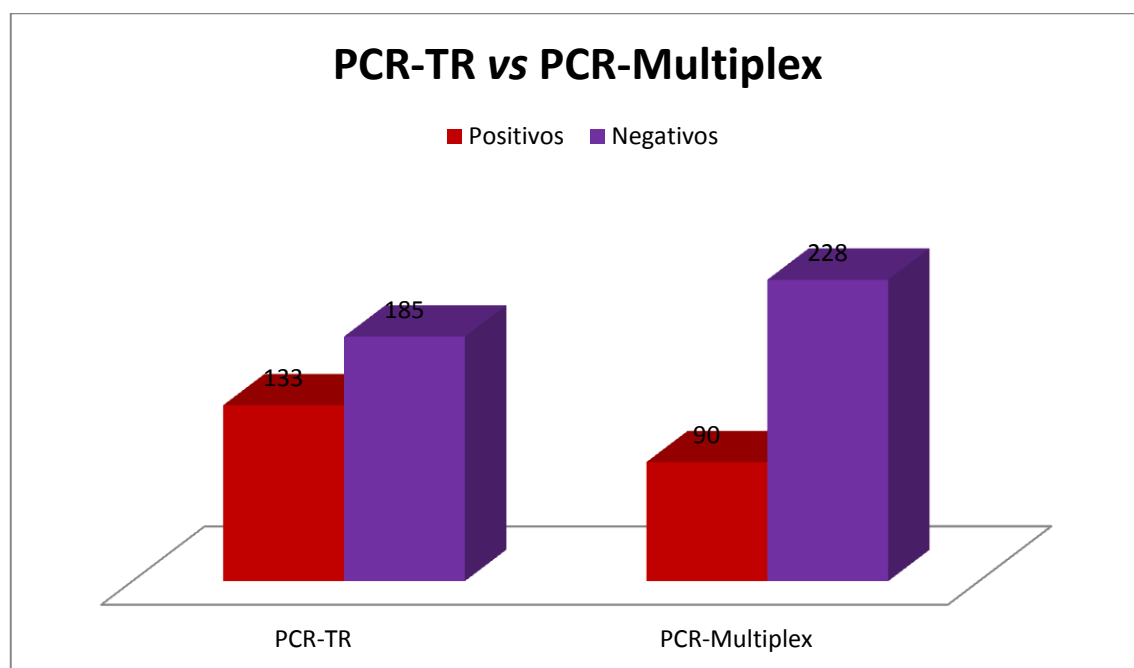


**Figura 16.** Grupos de indivíduos estudados para avaliação das técnicas de PCR-TR e PCR-Multiplex.

Das 318 amostras estudadas foi possível observar amplificação de ADN de *Treponema pallidum* em 133/318 (41,82%) e em 90/318 (28,30%), enquanto que o mesmo não se observou em 185/318 (58,18%) e em 228/318 (71,70%) pelas técnicas de PCR-TR e PCR-Multiplex respectivamente (figura 17).

Relativamente a estas amostras em 75/318 (23,58%) obteve-se amplificação de ADN bacteriano de *Treponema pallidum* por ambas as técnicas de PCR, e em 188/318 (59,12%) não se obteve qualquer amplificação.

Em 55/318 amostras só se observou amplificação por uma das técnicas: em 6/318 (1,89%) pela técnica de PCR-Multiplex, e em 49/318 (15,41%) pela técnica de PCR-TR.



**Figura 17.** Reactividade dos 318 soros estudados obtida com as técnicas de PCR-TR e PCR-Multiplex.

Comparando os resultados obtidos entre a técnica de PCR-Multiplex e a técnica de PCR-TR, verificou-se que a segunda detectou um maior número de casos positivos, apresentando uma sensibilidade de 100%, uma especificidade de 81,14% e uma taxa de concordância de 86,48% (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resultados obtidos com as técnicas PCR-TR e PCR-Multiplex.

		PCR-Multiplex		
PCR-TR		Reactivo	Não Reactivo	Total
	Reactivo	90	43	133
	Não Reactivo	0	185	185
Total		90	228	318

Sensibilidade (90/90) – 100%

Especificidade (185/228) – 81,14%

Taxa de concordância (275/318) – 86,48%

Relativamente aos 43 casos discrepantes, seis muito provavelmente referem-se a reações de falsa positividade da técnica de PCR-TR (33,42,70), pois estas amostras não obtiveram qualquer reactividade nos outros testes serológicos efectuados, assim como pertenciam a indivíduos considerados com ausência de sífilis, podendo estar relacionadas com eventual contaminação durante o processo de estudo; 37 eventualmente correspondem a reações de falsa negatividade da técnica PCR-Multiplex (33,42,70), uma vez que estas amostras obtiveram reactividade nos testes serológicos efectuados, e pertenciam a doentes com sífilis.

De seguida, avaliou-se os resultados obtidos pelas duas técnicas para os casos de sífilis nos diferentes estádios de infecção (sífilis activa) e em indivíduos considerados como não tendo sífilis.

A técnica de PCR-Multiplex apresentou uma sensibilidade de 43,31%, uma especificidade de 92,31% e uma taxa de concordância de 53,06% (Tabela 11).

**Tabela 11.** Sensibilidade e especificidade da técnica de PCR-Multiplex.

PCR-Multiplex		Sífilis activa	Sem sífilis	Total
	Reactivo	68	3	71
Não Reactivo	89	36	125	
Total	157	39	196	

Sensibilidade (68/157) – 43,31%

Especificidade (36/39) – 92,31%

Taxa de concordância (104/196) – 53,06%

A técnica de PCR-TR apresentou uma sensibilidade de 56,05%, uma especificidade de 84,62% e uma taxa de concordância de 61,73% (Tabela 12).

**Tabela 12.** Sensibilidade e especificidade da técnica PCR-TR.

PCR-TR		Sífilis activa	Sem sífilis	Total
	Reactivo	88	6	94
Não Reactivo	69	33	102	
Total	157	39	196	

Sensibilidade (88/157) – 56,05%

Especificidade (33/39) – 84,62%

Taxa de concordância (121/196) – 61,73%

Comparando os resultados obtidos com as duas técnicas para os casos de sífilis activa, verifica-se que a técnica de PCR-Multiplex apresenta uma sensibilidade e taxa de concordância inferior, o que indica que a técnica de PCR-TR possui maior sensibilidade e taxa de concordância. De referir, que ambas as técnicas possuem uma especificidade idêntica.

No que diz respeito à especificidade da técnica de PCR em tempo real o valor calculado neste estudo de 100% foi idêntico ao obtido noutros estudos em que a especificidade se situava entre os 87% e os 98%. (33,42,70)

De referir que os elevados valores de sensibilidade (que rondavam os 70% a 80%), correspondiam a amostras colhidas de lesões cutâneas ou mucosas, enquanto que o valor de sensibilidade de 56,05% obtido neste estudo muito provavelmente deve-se ao facto das amostras estudadas serem na sua maioria de sangue total, plasma ou soro.

Deste modo, quando comparadas as duas técnicas entre si, a técnica de PCR-TR parece funcionar de um modo muito mais eficaz. O facto de a técnica de PCR-TR utilizar apenas um par de *primers* parece conferir determinadas vantagens, uma vez que diminui a competição dos *primers* pelo ADN e porque facilita, em larga escala, as optimizações relativamente à mistura de reacção e condições de amplificação. É também uma técnica mais rápida, embora mais cara.

Após a comparação das técnicas de PCR em tempo real e PCR-Multiplex para as 318 amostras dos 236 doentes, estudou-se as 36 amostras das parturientes (23) e recém-nascidos (13) de Angola, com resultados positivos em um ou mais dos testes serológicos efectuados (RPR; TPHA e/ou EIA). Em nenhum dos casos foi obtida amplificação, quer pela técnica de PCR em tempo real, quer pela técnica PCR-Multiplex.

#### **4.1 Testes serológicos *versus* técnicas moleculares**

Dos 236 doentes, com pelo menos um teste específico e um não específico reactivo, foram amplificados 30/236 (12,71%) casos apenas pela técnica de PCR-TR, e somente pela técnica de PCR-Multiplex 4/236 (1,69%), enquanto que 50/236 (21,19%) casos o foram pelas duas técnicas de PCR.

Nestes mesmos casos, 15/236 (6,36%) obtiveram reactividade em todos os testes serológicos efectuados, bem como amplificação em ambas as técnicas de PCR; 10/236 (4,24%) foram reactivos com todos os testes serológicos efectuados, e amplificaram apenas com a técnica de PCR-TR; 1/236 (0,42%) reactivo em todos os testes serológicos e só amplificou com a técnica de PCR-Multiplex; e 11/236 (4,66%) reactivos nos testes serológicos efectuados, não apresentando amplificação em nenhuma das técnicas de PCR.

Todos os testes serológicos não reactivos e amplificação com a técnica de PCR-TR foi observado em 4/236 (1,69%) dos casos, os quais tinham sido categorizados como sem sífilis, o que leva a crer que estes resultados resultaram de reacções de falsa positividade desta técnica. O mesmo parece ter acontecido em um caso (1/236 (0,42%) de um indivíduo classificado como sem sífilis com todos os testes serológicos negativos

e amplificação pela técnica de PCR-Multiplex. Em 2/236 (0,85%) dos casos, todos os testes serológicos foram não reactivos e amplificaram em ambas as técnicas de PCR, e porque pertencentes ao grupo de indivíduos considerados como sem sífilis, pode colocar-se a mesma hipótese.

De todos os casos apenas 30/236 (12,71%) não obtiveram reactividade em nenhum dos testes serológicos executados, nem amplificaram com qualquer das duas técnicas de PCR. Estes resultados correspondiam aos 29 indivíduos classificados como não tendo sífilis e a um outro indivíduo com o diagnóstico de sífilis tratada (tabela 13 e 18).

**Tabela 13.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados sem infecção.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
NR	NR	NR	NR	Neg	Neg	29
NR	NR	NR	NR	Pos	Pos	2
R	NR	NR	NR	Neg	Neg	1
NR	NR	NR	NR	Pos	Neg	4
NR	NR	NR	NR	Neg	Pos	1
NR	NR	R	NR	Neg	Neg	2
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Pos – positivo ; Neg – negativo						

Relativamente aos doentes com diagnóstico de sífilis primária em 3/15 (20%) casos foram identificados através de um ou mais testes serológicos reactivos e por amplificação na técnica de PCR-TR; 8/15 (53,33%) foram confirmados através de um ou mais testes serológicos reactivos e amplificação em ambas as técnicas de PCR; e 4/15 (26,67%) foram identificados somente em um ou mais testes serológicos reactivos (tabela 14).

**Tabela 14.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis primária.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
R	R	R	NR	Neg	Neg	1
R	R	R	R	Pos	Neg	2
R	R	R	R	Pos	Pos	6
R	R	R	R	Neg	Neg	2
NR	R	R	NR	Neg	Neg	1
R	R	R	NR	Pos	Pos	2
NR	NR	R	R	Pos	Neg	1
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Pos – positivo ; Neg – negativo						

Em 21 doentes com diagnóstico de sífilis secundária, 3/21 (14,29%) foram identificados apenas com base em testes serológicos reactivos; 12/21 (57,14%) foram confirmados através de testes serológicos reactivos e por amplificação em ambas as técnicas de PCR; 5/21 (23,81%) foram identificados em testes serológicos reactivos e por amplificação na técnica de PCR-TR; e 1/21 (4,76%) foram identificados com testes serológicos reactivos e por amplificação na técnica de PCR-Multiplex (tabela 15).

**Tabela 15.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis secundária.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
R	R	R	NR	Neg	Neg	1
R	R	R	R	Pos	Pos	5
R	R	R	R	Neg	Neg	2
R	R	R	NR	Pos	Pos	3
R	R	R	NR	Pos	Neg	2
R	R	R	R	Pos	Neg	3
R	R	R	NR	Neg	Pos	1
R	R	NR	NR	Pos	Pos	3
NR	NR	NR	NR	Pos	Pos	1
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Pos – positivo ; Neg – negativo						

Em sete doentes com o diagnóstico de sífilis latente recente, 2/7 (28,57%) foram identificados somente em testes serológicos reactivos; 3/7 (42,86%) foram confirmados através de testes serológicos reactivos e por amplificação em ambas as técnicas de PCR; e 2/7 (28,57%) foram identificados em testes serológicos reactivos e amplificação apenas na técnica de PCR-TR (tabela 16).

**Tabela 16.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis latente recente.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
R	R	R	R	Pos	Pos	2
R	R	R	NR	Pos	Neg	1
R	R	R	R	Neg	Neg	1
R	R	NR	NR	Pos	Pos	1
R	R	NR	NR	Neg	Neg	1
R	R	NR	NR	Pos	Neg	1
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Pos – positivo ; Neg – negativo						

Dos 113 doentes com sífilis latente indeterminada, 62/113 (54,87%) foram identificados somente em testes serológicos reactivos; 28/113 (24,78%) foram confirmados com base nos testes serológicos reactivos e amplificação em ambas as técnicas de PCR; 20/113 (17,70%) foram identificados com testes serológicos reactivos e amplificação na técnica de PCR-TR; e 3/113 (2,65%) foram identificados com testes serológicos reactivos e amplificação na técnica de PCR-Multiplex (tabela 17).

**Tabela 17.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis latente indeterminada.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
R	R	R	NR	Neg	Neg	38
R	R	R	NR	Pos	Neg	13
R	R	R	R	Pos	Neg	5
R	R	R	NR	Pos	Pos	22
R	R	R	NR	Neg	Pos	1
R	R	R	R	Pos	Pos	2
R	NR	R	NR	Neg	Neg	1
R	R	R	R	Neg	Neg	6
R	NR	R	NR	Pos	Pos	1
R	R	NR	NR	Neg	Neg	5
R	R	NR	NR	Neg	Neg	12
R	R	NR	NR	Pos	Neg	2
R	R	R	R	Neg	Pos	1
R	R	NR	NR	Neg	Pos	1
R	R	NR	NR	Pos	Pos	3
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Pos – positivo ; Neg – negativo						

De 41 doentes foi-lhes diagnosticada sífilis, mas esta já tinha sido tratada, sendo que 35/41 (85,37%) foram identificados somente nos testes serológicos reactivos; 1/41 (2,44%) foi confirmada com os testes serológicos reactivos e amplificação em ambas as técnicas de PCR; 5/41 (12,20%) foram identificados com base em testes serológicos reactivos e por amplificação na técnica de PCR-TR (tabela 18).

**Tabela 18.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex nos indivíduos considerados com sífilis já tratada.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
R	R	NR	NR	Neg	Neg	1
R	R	R	NR	Pos	Neg	1
NR	R	R	NR	Pos	Neg	4
R	R	R	NR	Neg	Neg	11
NR	NR	R	NR	Neg	Neg	1
NR	R	R	NR	Neg	Neg	13
NR	R	R	NR	Pos	Pos	1
NR	NR	NR	NR	Neg	Neg	1
R	R	NR	NR	Neg	Neg	3
NR	R	NR	NR	Neg	Neg	5
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Pos – positivo ; Neg – negativo						

Dos 236 indivíduos estudados apenas um apresentou o diagnóstico de neurosífilis, sendo que este foi apenas foi identificado através de testes serológicos reactivos, pois tanto na técnica de PCR-TR, como na técnica PCR-Multiplex não se registou qualquer amplificação (tabela 19).

**Tabela 19.** Comparação dos testes serológicos com as técnicas PCR-TR e Multiplex no indivíduo considerado com neurosífilis.

RPR	TPHA	FTA-Abs (IgG)	FTA-Abs (IgM)	PCR-TR	PCR- Multiplex	Nº Casos
R	R	R	NR	Neg	Neg	1
Legenda: R – reactivo ; NR – não reactivo ; Neg – negativo						

## 4. CONCLUSÕES

O diagnóstico clínico e laboratorial da sífilis apresenta muitas dificuldades e limitações, relacionados com a complexidade da doença que se caracteriza por diversos estádios, apresentando períodos assintomáticos e sintomáticos, o que vem corroborar a premissa de que ainda há muito a fazer relativamente ao diagnóstico laboratorial desta doença. Esta problemática prende-se com os inúmeros e diversos estudos que têm vindo a ser elaborados tendo como objectivo a avaliação dos resultados dos testes serológicos em diversos tipos de amostras, bem como os que têm sido efectuados na busca de uma técnica de PCR-clássica ou em tempo real que sejam eficazes em todas as fases da doença.

O presente estudo teve como objectivo caracterizar os casos de sífilis congénita, incluindo a avaliação dos testes que se utilizam para o seu diagnóstico e a sua abordagem clínica e terapêutica. Pretendeu ainda otimizar uma técnica de PCR em tempo real, para averiguar o potencial desta na detecção de ADN de *Treponema pallidum*.

Os testes serológicos efectuados e posteriormente analisados, demonstram resultados semelhantes e aparentam uma efectividade e fiabilidade diagnóstica aceitável. Contudo, um diagnóstico certo e preciso, persiste ainda como um problema, devido ao facto de não haver cultura para o microrganismo *Treponema pallidum*; e de existirem fases da doença assintomáticas.

Após a obtenção dos resultados desta tese, pode concluir-se que o teste RPR é o teste não treponémico que deve ser sempre utilizado quando existe suspeita de sífilis, e tem como grande vantagem o facto de permitir efectuar a monitorização da terapêutica. Muito embora, no presente estudo, o teste RPR e o teste VDRL tenham apresentando resultados semelhantes ao nível da sensibilidade e especificidade, segundo vários estudos, actualmente, o teste RPR é o mais preconizado enquanto teste não treponémico, pois é mais fácil de executar e de mais fácil leitura dos resultados.

Quanto ao teste treponémico imunoenzimático, parece ser aquele que mais se adapta à rotina laboratorial, pois os resultados deste teste foram semelhantes aos outros testes treponémicos vastamente recomendados (TPHA e FTA-Abs), e possui a vantagem de ser automatizável e permitindo uma leitura objectiva. Mediante

comparação com outros estudos, o teste imunoenzimático tem apresentado resultados a nível da sensibilidade e especificidade superior aos outros testes treponémicos e actualmente surge como técnica referência a nível de testes treponémicos, sendo presentemente recomendado pelas normas Europeias como teste de rastreio da infecção por *Treponema pallidum*.

No que diz respeito ao diagnóstico de sífilis congénita, pode concluir-se que a técnica de western-blot apresentou uma maior sensibilidade e especificidade na pesquisa de anticorpos de tipo IgM do que a técnica de FTA-Abs-M, e no futuro poderá vir a ser utilizada como recomendada para um diagnóstico mais preciso e eficaz quer de infecção recente quer de infecção congénita pelo *Treponema pallidum*. Muito embora já existam alguns estudos, em que a técnica de western-blot obteve melhores resultados comparativamente com a técnica de FTA-Abs-M, ainda são necessários mais estudos que permitam sustentar esta premissa.

No caso do recém-nascido uma técnica que pesquisa anticorpos específicos de tipo IgM, permite elaborar um diagnóstico correcto e preciso de sífilis congénita.

Relativamente às técnicas de biologia molecular, verificou-se uma maior sensibilidade e especificidade na pesquisa de ADN de *Treponema pallidum* pela técnica de PCR-TR, comparativamente com a técnica PCR-clássica (133 vs 90 amostras positivas, respectivamente). A técnica de PCR em tempo real quando aplicada a amostras de lesões mucosas ou cutâneas ou mesmo de sangue total se provenientes de indivíduos com estádios de infecção de sífilis primária e/ou secundária, apresenta valores de sensibilidade mais elevados. Em relação a outros estudos, a técnica de PCR em tempo real obteve melhores resultados quando avaliada relativamente à técnica de PCR-clássica, mas ainda não consegue alcançar o mesmo desempenho na comparação com os testes serológicos.

Independentemente do facto do genoma de *Treponema pallidum* ter sido publicado e de se terem feito diversos estudos desde então no que diz respeito à sua estrutura e biologia molecular, existe ainda muito a fazer para que o diagnóstico desta doença seja efectuado o mais precocemente possível e com o maior grau de certeza.

Mediante os resultados obtidos na realização do presente estudo, pode concluir-se que o teste treponémico (EIA) parece ser o mais indicado para o rastreio da infecção por *Treponema pallidum*, tendo como único inconveniente o facto de ser uma técnica

algo dispendiosa, contudo um resultado reactivo com esta técnica, deve ser confirmado pela realização de um teste não treponémico, preferencialmente o teste RPR.

Relativamente ao diagnóstico de infecção congénita no recém-nascido, o teste western-blot para pesquisa de anticorpos específicos de tipo IgM, parece ser o mais apropriado.

Quanto aos testes de biologia molecular, a técnica de PCR em tempo real, parece ser a mais indicada, uma vez que esta apresenta uma maior sensibilidade e especificidade quando comparada com a técnica de PCR-clássica, tendo como forte desvantagem, o facto de ser uma técnica dispendiosa.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abarzúa, F., Belmar, C., Rioseco, A., Parada, J., Quiroga, T., and García, P.**, 2008. Pesquisa de sífilis congênita al momento del parto: Suero materno o sangre de cordón?. *Rev Chil Infect.* **25**: 155-161.
2. **Arnold, S., and Jones, E.**, 2000. Congenital syphilis: A guide to diagnosis and management. *Pediatr Child Health.* **5**: 463-469.
3. **Association of Public Health Laboratories**, 2009. Laboratory Diagnostic Testing for *Treponema pallidum*. Expert Consultation Meeting Summary Report.
4. **Ballard, R., Htun, Y., Fehler, G., and Neilsen, G.**, 2000. Syphilis, p. 19-28, *In* Ballard, R., Htun, Y., Fehler, G., and Neilsen, G., 3<sup>a</sup> (ed). The Diagnosis and management of sexually transmitted infections in Southern Africa. Center for Sexually Transmitted Diseases. Johannesburg.
5. **Barsanti, C., Valdetaro, F., Diniz, E., and Succi, R.**, 1999. Diagnostic of congenital syphilis: a comparison between serological tests in mother and respective newborn. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* **32**: 605-611.
6. **Berman, S. M.**, 2004. Maternal syphilis: pathofisiology and treatment. *Bulletin of the World Health Organization.* **Vol. 82, No. 6**: 433-438.
7. **Castro, A., Kikkert, S., Fears, M., and Pope, V.**, 2002. Defibrination of Blood Plasma for Use in Serological Tests for Syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* **9**: 1376-1378.
8. **Castro, A., Esfandiari, J., Kumar, S., Ashton, M., Kikkert, S., Park, M., Ballard, R.**, 2010. Novel Point-of-Care Test for Simultaneous Detection of Nontreponemal and Treponemal Antibodies in Patients with Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology.* **48**: 4615-4619.
9. **Castro, R.**, 2004. Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem. Dissertação de Doutorado. Universidade Nova de Lisboa.

10. **Castro, R., Prieto, E., Santo, I., Azevedo, J., and Exposto, F.,** 2001. Evaluation of the Passive Particle Agglutination Test in the Serodiagnosis and Follow-up of Syphilis. *Am J Clin Pathol.* **116:** 581-585.
11. **Castro, R., Prieto, E., Santo, I., Azevedo, J., and Exposto, F.,** 2003. Evaluation of an Enzyme Immunoassay Technique for Detection of Antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology.* **41:** 250-253.
12. **Castro, R., Prieto, E., and Pereira, F.,** 2008. Nontreponemal Tests in the Diagnosis of Neurosyphilis: An Evaluation of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) and the Rapid Plasma Reagin (RPR) Tests. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* **22:** 257-261.
13. **Castro, R., Prieto, E., Águas, M., Manata, M., Botas, J., and Pereira, F.,** 2009. Molecular Subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *Journal of Clinical Microbiology.* **Vol. 47, No. 8:** 2510-2512.
14. **Centers for Disease Control and Prevention,** 2010. Congenital Syphilis – United States, 2003-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* **59:** 413-446.
15. **Champion, C., Blanco, D., and Lovett, M.,** 2005. Quantitative Assessment of Protection in Experimental Syphilis. *Infection and Immunity.* **73:** 5923-5927.
16. **Chaudhary, M., Kashyap, B., and Bhalla, P.,** 2007. Congenital syphilis, still a reality in 21<sup>st</sup> century: a case report. *Journal of Medical Case Reports.* **1:** 90-92.
17. **Chen, C., Chi, K., George, R., Cox, D., Srivastava, A., Silva, M., Carneiro, F., Lauwers, G., and Ballard, R.,** 2006. Diagnosis of Gastric Syphilis by Direct Immunofluorescence Staining and Real-Time PCR Testing. *Journal of Clinical Microbiology.* **44:** 3452-3456.
18. **Coordenação do Programa Estadual DST/Aids-SP,** 2008. Congenital syphilis and syphilis during pregnancy. *Revista Saúde Pública.* **42:** 768-772.
19. **Diez, C., Torre, M., Diez, M.,** 2008. Congenital syphilis in a 7-week old baby: Could it be prevented with another protocol?. *J.anpedi.* **10.1016:** 190-191.
20. **Díez, M., and Díaz, A.,** 2011. Infecciones de transmisión sexual: epidemiología y control. *Rev Esp Sanid Penit.* **13:** 58-66.

21. **Fonck, K., Claeys, P., Bashir, F., Bwayo, J., Fransen, L., Temmerman, M.,** 2001. Syphilis Control During Pregnancy: Effectiveness and Sustainability of a Decentralized Program. *American Journal of Public Health.* **91:** 705-707.
22. **French, P.,** 2007. Syphilis. *BMJ.* **334:** 143-147.
23. **French, P., Gomberg, M., Janier, M., Schmidt, B., van Voorst Vader, P., and Young, H.,** 2008. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *International Journal of STD & AIDS.* **20:** 300-309.
24. **Gayet-Ageron, A., Ninet, B., Toutous-Trellu, L., Lautenschlager, S., Furrer, H., Piguet, V., Schrenzel, J., and Hirschel, B.,** 2009. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Inf.* **10:** 1-17.
25. **Giacani, L., Molini, B., Godornes, C., Barrett, L., Voorhis, W., Centurion-Lara, A., and Lukehart, S.,** 2007. Quantitative Analysis of tpr Gene Expression in *Treponema pallidum* Isolates: Differences among Isolates and Correlation with T-Cell Responsiveness in Experimental Syphilis. *American Society for Microbiology.* **75:** 104-112.
26. **Genç, M., and Ledger, W. J.,** 2006. Syphilis in pregnancy. *Sexually Transmitted Infections.* **76:** 73-79.
27. **Goh, B., and Thornton, A.,** 2007. Antenatal screening for syphilis. *Sex Transm Infect.* **83:** 345-346.
28. **Goh, T.,** 2005. Syphilis in adults. *Sex Transm Infect.* **81:** 448-452.
29. **Halling, V., Jones, M., Bestrom, J., Wold, A., Rosenblatt, J., Smith, T., and Cockerill, F.,** 1999. Clinical Comparison of the *Treponema pallidum* CAPTIA Syphilis-G Enzyme Immunoassay with the Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Immunoglobulin G Assay for Syphilis Testing. *Journal of Clinical Microbiology.* **37:** 3233-3234.
30. **Hawkes, S., Miller, S., Reichenbach, L., Nayyar, A., and Buse, K.,** 2004. Antenatal syphilis control: people, programmes, policies and politics. *Bulletin of the World Health Organization.* **82:** 417-423.
31. **Herremans, M., Notermans, D., Mommers, M., and Kortbeek, L.,** 2007. Comparison of a *Treponema pallidum* IgM immunoblot with a 19S fluorescent

- treponemal antibody absorption test for the diagnosis of congenital syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **59**: 61-66.
32. **Herremans, T., Kortbeek, L., and Notemans D.**, 2010. A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. **29**: 495-501.
  33. **Heymans, R., Helm, J., Vries, H., Fennema, H., Coutinho, R., and Bruisten, S.**, 2010. Clinical Value of *Treponema pallidum* Real-Time PCR for Diagnosis of Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: 497-502.
  34. **Ishaque, S., Yakoob, M., Imdad, A., Goldenberg, R., Eisele, T., Bhutta, Z.**, 2011. Effectiveness of interventions to screen and manage infections during pregnancy on reducing stillbirths: a review. *BMC Public Health*. **11**: 1-12.
  35. **Kamb, M., Newman, L., Riley, P., Mark, J., Hawkes, S., Malik, T., and Broutet, N.**, 2010. A Road Map for the Global Elimination of Congenital Syphilis. *Obstetrics and Gynecology International*. **10.1155**: 1-6.
  36. **Kingston, M., French, P., Goh, B., Goold, P., Higgins, S., Sukthankar, A., Stott, C., Turner, A., Tyler, C., and Young, H.**, 2008. UK National Guidelines on the Management of Syphilis 2008. *International Journal of STD & AIDS*. **19**: 729-740.
  37. **Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., and Winn, W.**, 2001. Infecções por Espiroquetas, *Treponema*. p. 966-975. In Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P., and Winn, W., 5<sup>a</sup> (ed), *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido*. Editora Médica e Científica, Ltda.
  38. **Lafond, R., and Lukehart, S.**, 2006. Biological basis for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*. **19**: 29-49.
  39. **Larsen, S., Pope, V., Johnson, R., and Kennedy, E.**, 1998. 9<sup>a</sup> (ed), *A Manual of Tests for Syphilis*. American Public Health Association, Washington, D.C.
  40. **Lee, B., Robinson, J., and Wong, T.**, 2006. Early congenital syphilis. *CMAJ*. **177**: 752.
  41. **Lee, V., and Kinghorn, G.**, 2008. Syphilis: an update. *Clinical Medicine*. **Vol. 8, No. 3**: 330-333.
  42. **Leslie, D., Azzato, F., Karapanagiotidis, T., Leydon, J., and Fyfe, J.**, 2007. Development of a Real-Time PCR Assay To Detect *Treponema pallidum* in

- Clinical Specimens and Assessment of the Assay's Performance by Comparison with Serological Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 93-96.
43. **Lewis, D., and Young, H.**, 2010. Syphilis. *Sexually Transmitted Infections*. **82**: 13-15.
  44. **Li, Y., and Gonik, B.**, 2006. Is Congenital Syphilis Really Congenital Syphilis?. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. **10.1155**: 1-4.
  45. **Liu, H., Rodes, B., Chen, C., and Steiner, B.**, 2001. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**: 1941-1946.
  46. **Mabey, D., Peeling, R., Ballard, R., Benzaken, A., Galbán, E., Chagalucha, J., Everett, D., Balira, R., Fitzgerald, D., Joseph, P., Nerette, S., Li, J., and Zheng, H.**, 2006. Prospective, multi-centre clinic-based evaluation of four rapid diagnostic tests for syphilis. *Sex Transm Infect*. **82**: 13-16.
  47. **Martin, D., Bertrand, J., McKegney, C., Thompson, L., Belongia, E., and Mills, W.**, 2001. Congenital Syphilis Surveillance and Newborn Evaluation in a Low-Incidence State. *Arch Pediatr: Adolesc Med*. **155**: 140-144.
  48. **Matteelli, A., Punta, V., Angeli, A., Basché, R., Carvalho, A., Tomasoni, L., Laco, G., and Spandrio, M.**, 2007. Congenital syphilis in Italy. *Sex Transm Infect*. **83**: 590-591.
  49. **Mossad, S.**, 2003. How do you manage a healthy, asymptomatic, 24-year-old with a positive RPR on a premarital blood test?. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. **70**: 101-102.
  50. **Muller, M., Ewert, I., Hansmann, F., Tiemann, C., Hagedorn, H., Salbach, W., Roider, J., Nolle, B., Laqua, H., and Hoerauf, H.**, 2007. Detection of *Treponema pallidum* in the vitreous by PCR. *Br J Ophtalmol*. **91**: 592-595.
  51. **Mullick, S., Beksinksa, M., and Msomi, S.**, 2005. Treatment for syphilis in antenatal care: compliance with the three dose standard treatment regimen. *Sex Transm Infect*. **81**: 220-222.
  52. **Neamtu, S., Gaman, G., Stanca, L., Buzatu, I., Dijmarescu, L., and Manolea, M.**, 2011. The contribution of laboratory investigation in diagnosis of congenital infections. *Rom J Morphol Embryol*. **52**: 481-484.

53. **Organização Mundial de Saúde.**, 2008. Eliminação Mundial da Sífilis Congênita: Fundamento Lógico e Estratégia para Acção. 1-37.
54. **Orle, K., Gates, C., Martin, D., Body, B., and Weiss, J.**, 1996. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and Herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 49-54.
55. **Peeling, R., and Ye, H.**, 2004. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. *Bulletin of the World Health Organization*. **Vol. 82, No. 6**: 439-446.
56. **Peeling, P., Holmes, K., Mabey, D., and Ronald, A.**, 2006. Rapid Tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. *Sex Transm Infect*. **82**: 1-6.
57. **Peeling, R., and Hook, E.**, 2006. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. *Journal of Pathology*. **208**: 224-232.
58. **Pope, V., Fears, M., Morrill, W., Castro, A., Kikkert, S.**, 2000. Comparison of the Serodia *Treponema pallidum* Particle Agglutination, Captia Syphilis-G, and SpiroTek Reagin II Tests with Standard Test Techniques for Diagnosis of Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 2543-2545.
59. **Ratnam, S.**, 2005. The laboratory diagnosis of syphilis. *Canadian Journal Infectious Diseases Medical Microbiology*. **16**: 45-51.
60. **Rawstron, S., Vetrano, J., Tannis, G., and Bromberg, K.**, 1997. Congenital Syphilis: Detection of *Treponema pallidum* in Stillborns. *Clinical Infectious Diseases*. **24**: 24-27.
61. **Rodrigues, C., Guimarães, M., and César, C.**, 2008. Missed opportunities for congenital syphilis and HIV perinatal transmission prevention. *Revista Saúde Pública*. **42**: 851-858.
62. **Rodríguez, I., Álvarez, E., Fernández, C., and Miranda, A.**, 2002. Comparison of a Recombinant-antigen Enzyme Immunoassay with *Treponema pallidum* Hemagglutination Test for Serological Confirmation of Syphilis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **97**: 347-349.
63. **Salazar, J., Rathi, A., Michael, N., Radolf, J., and Jagodzinski, L.**, 2007. Assessment of the Kinetics of *Treponema pallidum* Dissemination into Blood

and Tissues in Experimental Syphilis by Real-Time Quantitative PCR. *Infection and Immunity*. **75**: 2954-2958.

64. **Saloojee, H., Velaphi, S., Goga, Y., Afadapa, N., Steen, R., and Lincetto, O.**, 2004. The prevention and management of congenital syphilis: an overview and recommendations. *Bulletin of the World Health Organization*. **82**: 424-432.
65. **Saraceni, V., Guimarães, M., Filha, M., and Leal, M.**, 2005. Perinatal mortality due to congenital syphilis: a quality-of-care indicator for women's and children's healthcare. *Cad. Saúde Pública*. **21**: 1244-1250.
66. **Schmid, G.**, 2004. Economic and programmatic aspects of congenital syphilis prevention. *Bulletin of the World Health Organization*. **82**: 402-409.
67. **Simms, I., and Ward, H.**, 2006. Congenital syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect*. **82**: 1.
68. **Singh, A., and Romanowski, B.**, 1999. Syphilis: Review with Emphasis on Clinical, Epidemiologic, and Some Biologic Features. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**: 187-209.
69. **Sothinathan, U., Hannam, S., Fowler, A., Zuckerman, M., Reeves, I., and Flowers, M.**, 2006. Detection and follow up of infants at risk of congenital syphilis. *Arch Dis Child*. **91**: 620-625.
70. **Tipple, C., Hanna, M., Hill, S., Daniel, J., Goldmeier, D., McClure, M., Taylor, G.**, 2011. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect*. **87**: 479-485.
71. **U.S. Preventive Services Task Force**, 2009. Screening for Syphilis Infection in Pregnancy: U.S. Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *Annals of Internal Medicine*. **150**: 705-709.
72. **Walker, D., and Walker, G.**, 2004. Prevention of congenital syphilis – time for action. *Bulletin of the World Health Organization*. **82**: 401-402.
73. **Warner, L., and Steiner, M.**, 2002. Congenital syphilis – missed opportunities for prenatal intervention. *Sextransinf*. 224-225.
74. **Welch, R., and Litwin, C.**, 2010. Evaluation of Two Immunoblot Assays and a Western Blot Assay for the Detection of Antisyphilis Immunoglobulin G Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*. **17**: 183-184.

75. **Wendel, G., Sheffield, J., Hollier, L., Hill, J., Ramsey, P., and Sánchez, P.,** 2002. Treatment of Syphilis in pregnancy and Prevention of Congenital Syphilis. *Clinical Infectious Diseases*. **35**: 200-209.
76. **Wicher, K., Wicher, V., Abbruscato, F., and Baughn, R.,** 2000. *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* Displays Pathogenic Properties Different from Those of *T.pallidum* subsp. *pallidum*. *Infection and Immunity*. **68**: 3219-3225.
77. **Wicher, V., and Wicher, K.,** 2001. Pathogenesis of Maternal-Fetal Syphilis Revisited. *Clinical Infectious Diseases*. **33**: 354-363.
78. **Woods, C.,** 2005. Syphilis in Children: Congenital and Acquired. Elsevier. **16**: 245-257.
79. **Workowski, K., and Berman, S.,** 2010. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **59**: 1-110.
80. **Woznicová, V., Smajs, D., Weschsler, D., Matejková, P., and Flasarová, M.,** 2007. Detection of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* from Skin Lesions, Serum, and Cerebrospinal Fluid in an Infant with Congenital Syphilis after Clindamycin Treatment of the Mother during Pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 659-661.
81. **Zanto, S.,** 2010. Changing Algorithms in Syphilis Laboratory Diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter*. **32**: 59-64.