



**Infecção por *Treponema pallidum*: análise serológica e pesquisa de
DNA**

Lino José Manuel Ferreira

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Janeiro de 2013



**Infecção por *Treponema pallidum*: análise serológica e pesquisa de
DNA**

Lino José Manuel Ferreira

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientadora: Professora Doutora Rita M. R. Teixeira de Castro
Co-Orientação: Professora Doutora Filomena L. Martins Pereira

**Unidade de Doenças Sexualmente Transmitidas do Instituto de Higiene
e Medicina Tropical, Rua da Junqueira 100, 1349-007 Lisboa, Portugal.**

Janeiro de 2013

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Rita Maria Rodrigues Teixeira de Castro, minha orientadora pela prestimosa ajuda na orientação deste trabalho, na transmissão de seus conhecimentos e conselhos que resultaram no seguimento das normas e técnicas implementadas nesta tese assim como, pela disponibilidade ao longo de todo trabalho, o meu muito obrigada.

À Professora Doutora Filomena da Luz Martins Pereira, co-orientadora pela forma calorosa, acolhimento e acompanhamento deste trabalho.

À Dra. Emília Prieto pelo apoio incondicional, paciência e tempo disponibilizado em transmitir os seus conhecimentos teóricos e práticos ao longo do desenvolvimento deste estudo.

À todos os Professores do Mestrado em Microbiologia Médica pela paciência e sabedoria como transmitiram os seus conhecimentos.

As técnicas Teresa e Fernanda, pelo apoio que sempre prestaram.

Ao colega David Janeiro, como amigo e companheiro de trabalho laboratorial pelo apoio, dedicação e auxílio prestado ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas de turma e, em especial Lisa Machado à qual desejo sucessos na sua vida.

Ao Dr. Manuel Francisco Dias pelo incentivo e apoio disponibilizado.

Agradece-se ao Dr. Tomás António, Dr. Abreu Pacamena Tondesso, aos técnicos George Ernesto Lucala, Horácio, Isabel Bravo, Lucrecia e todos os outros não enumerados, pelo auxílio prestado ao longo da colheita das amostras.

Aos meus familiares, as minhas desculpas por não nomear, e porque eles sabem quem são, pela força, amizade e compreensão demonstrado ao longo deste tempo.

Aos meus amigos, pelo apoio, orgulho e incentivo dado durante toda a formação.

RESUMO

A sífilis é uma infecção causada por *T. pallidum* que pode ser transmitida por via vertical, por contacto sexual ou por sangue, e cujo diagnóstico se baseia na associação entre manifestações clínicas e testes serológicos.

Neste estudo utilizaram-se os testes serológicos RPR, TPHA, FTA-Abs, um teste rápido não comercializado (Signal-Spirolipin) que pesquisa anticorpos treponémicos (CDC-T) e não treponémicos (CDC-2) em simultâneo no mesmo dispositivo e uma técnica de PCR-multiplex para a pesquisa de ADN de *T. pallidum*.

Da comparação das técnicas serológicas constatou-se que a sensibilidade dos testes RPR e TPHA foi de 84,5% e 98% respectivamente. A especificidade foi de 77,3% para o teste RPR e de 87,5% para o teste TPHA.

Na avaliação do teste rápido a comparação do teste CDC-2 com o teste RPR resultou numa taxa de concordância de 93,1% enquanto que, a do teste CDC-T com o teste TPHA foi de 94,8%. A sensibilidade e especificidade obtidas pelos testes CDC-2 e CDC-T foram de 88,7% e 65% e de 94,9% e 91,3% respectivamente.

Considerando o diagnóstico de sífilis activa com base na reactividade simultânea dos testes RPR e TPHA, avaliou-se a sensibilidade do teste rápido utilizando esse mesmo critério. A sensibilidade obtida foi de 98,4% para o teste rápido e de 97,2% para a associação dos testes RPR/TPHA.

A técnica de PCR-multiplex apresentou fraca sensibilidade já que em apenas 33% dos casos de sífilis foi identificado ADN de *T. pallidum*.

O teste rápido avaliado apresentou um comportamento idêntico aos testes geralmente utilizados na rotina laboratorial tais como os utilizados neste estudo. Apresenta a vantagem de pesquisar anticorpos treponémicos e não treponémicos, ao contrário dos testes rápidos comercializados que pesquisam apenas anticorpos treponémicos. Não sendo necessário para a sua execução equipamento laboratorial especializado poderá ser de grande utilidade para o clínico a exercer em locais sem laboratório.

Palavras-chave: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*; sífilis; testes serológicos; diagnóstico; PCR-multiplex; Signal-Spirolipin.

ABSTRACT

Syphilis is an infection caused by *T. pallidum*. Transmission may be vertical, through sexual contact or blood.

The diagnosis is based in both serology and clinical manifestations. In this study, we used the serological tests RPR, TPHA, FTA-Abs and a non-commercialized rapid test (Signal-Spirolipin) to detect both treponemal (CDC-T) and non-treponemal antibodies (CDC-2) in the same device. *T. pallidum* DNA was identified with a multiplex PCR technique.

In this study, the RPR and TPHA tests sensitivity was 84,5% and 98%, respectively, and the specificity 77,3% for the RPR test and 87,5% for TPHA test, respectively.

The concordance rate was 93,1% in the comparison between the RPR and the CDC2 tests and 94,8% between the CDC-T with the TPHA tests. Sensitivity and specificity of the CDC-2 and CDC-T tests were 88,7% and 65% and 94,9% e 91,3%, respectively.

Taking into account that the diagnosis of active syphilis is made when both the RPR and TPHA tests are reactive, we evaluated the sensitivity of the rapid test (CDC2 and CDCT) in the diagnosis of active syphilis, using the above described criteria. The sensitivity was 98,4 % for the rapid test and 97,2 % for the association of reactivity in both RPA and TPHA tests.

The multiplex PCR technique presented a low sensitivity, with *T. pallidum* DNA being identified in only 33% of the syphilis cases.

The rapid test evaluated in this study presented identical results to the tests generally used in the routine laboratory diagnosis, such as those used here. However, it does have the advantage of detecting both treponemal and non-treponemal antibodies what is not the case of the commercialized rapid test. Furthermore, there is no need of specialized laboratory equipment, which makes it of great utility in regions where such conditions do not exist, as in developing countries.

Keywords: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*; syphilis; serological tests; diagnosis; multiplex PCR; Signal-Spirolipin.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE GERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contexto Histórico.....	1
1.2. Características do Agente.....	3
1.2.1. Taxonomia e Classificação.....	3
1.2.2. Características do Género <i>Treponema</i>	3
1.2.3. Características de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	5
1.3. Patogenicidade e Imunidade.....	7
1.4. Transmissão e Epidemiologia.....	9
1.5. Evolução Natural da Doença e Manifestações Clínicas.....	10
1.5.1. Estádio Primário.....	11
1.5.2. Estádio Secundária.....	12
1.5.3. Estádio Latente.....	13
1.5.4. Estádio Terciária.....	13
1.5.5. Sífilis Congénita.....	15
1.6. Diagnóstico Laboratorial.....	16

1.6.1. Método de Detecção Directa de <i>Treponema pallidum</i>	16
1.6.1.1. Métodos Microscópicos.....	16
1.6.1.2. Métodos de Biologia Molecular.....	17
1.6.2. Métodos Serológicos.....	19
1.7. Tratamento.....	23
1.8. Objectivos.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1. População e Amostras.....	26
2.1.1. Preparação das Amostras.....	27
2.2. Métodos.....	27
2.2.1. Teste Serológico Não Treponémico.....	27
2.2.2. Teste Serológico Específico.....	28
2.2.2.1. Teste de hemaglutinação-TPHA.....	28
2.2.2.2. Teste de Imunofluorescência Indirecta.....	30
2.2.3. Teste Signal-Spirolipin (CDC).....	32
2.2.4. Pesquisa de DNA de <i>Treponema pallidum</i>	33
2.2.4.1. Extracção de DNA Total.....	34
2.2.4.2. Amplificação de DNA de <i>Treponema pallidum</i> -PCR Diagnóstica.....	35
3. RESULTADOS	37
3.1. Pesquisa de Anticorpos Anti- <i>T. pallidum</i>	37
3.1.1. Análise Geral.....	37
3.1.2. Comparação dos Testes Serológicos.....	38

3.1.3. Avaliação do teste rápido Signal-Spirolipin (CDC).....	41
3.1.3.1. Teste Signal-Spirolipin (teste não treponémico CDC- 2).....	43
3.1.3.2. Teste Signal-Spirolipin (teste treponémico CDC- T).....	45
3.1.4. Amplificação de DNA de <i>Treponema pallidum</i> -PCR Diagnóstico.....	49
4. CONCLUSÕES.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura da bactéria <i>T. pallidum</i>	4
Figura 1.2. Imagem de lesão única no dedo no local da inoculação de sífilis.....	11
Figura 1.3. Imagem de má formação dentária típica de lesão congênita.....	16
Figura 2.4. Teste RPR. A+: exemplo de uma amostra reactiva e sua titulação; A-: amostra não reactiva.....	28
Figura 2.5. Exemplo de teste TPHA reactivo e controlos.....	29
Figura 2.6. Exemplo de um resultado reactivo do FTA-Abs à observação microscópica de fluorescência.....	31
Figura 2.7. Teste Signal-Spirolipin.....	33
Figura 2.8. Visualização em gel de agarose dos produtos (controlos) amplificados.....	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Caracterização da população estudada.....	26
Tabela 2.2. Gene alvo, descrição de sequência de <i>primers</i> e tamanho dos produtos amplificados pela técnica PCR-M.....	35
Tabela 3.3. Resultados obtidos com os testes RPR e TPHA.....	37
Tabela 3.4. Resultados obtidos com os testes de RPR e TPHA.....	37
Tabela 3.5. Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e FTA-Abs.....	39
Tabela 3.6. Comparação dos resultados obtidos com os testes TPHA e FTA-Abs.....	41
Tabela 3.7. Resultados obtidos com o testes <i>Signal-Spirolipin</i>	42
Tabela 8.8. Comparação dos resultados obtidos com os testes CDC-2 e RPR.....	43
Tabela 3.9. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-2 e TPHA.....	44
Tabela 3.10. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-2 e FTA-Abs.....	45
Tabela 3.11. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-T e TPHA....	45
Tabela 3.12. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-T e FTA- Abs.....	47
Tabela 3.13. Sensibilidade e especificidade dos testes RPR, CDC-2, TPHA e CDC-T em comparação com o teste FTA-Abs.....	48
Tabela 3.14. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M nas amostras de soro, dos indivíduos com sífilis activa.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µl: microlitro

µM: micromolar

ATP: adenosina trifosfato

AVC: acidente vascular cerebral

bp: pares de bases

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CDC-2: Signal-Spirolipin 2

CDC-T: Signal-Spirolipin " T "

DNA: desoxyribonucleic acid (ácido desorribonucleico)

dNTP's: desorribonucleotídeos trifosfatos

DST: doença sexualmente transmissíveis

E.U.A: Estados Unidos da América

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EIA: ensaio imunoenzimático

Especif.: especificidade

FTA-Abs: 'Fluorescent Treponema Antibody Absorbed' - teste de imunofluorescência indirecta

HIV: 'Human Immunodeficiency Virus' - vírus da imunodeficiência humana

HSH: homens que têm sexo com homens

IgG: imunglobina G

IgM: imunglobina M

IHMT: Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IHMT: Instituto de Higiene e Medicina Tropical

KDa: kilodaltons

LCR-líquido céfalo-raquidiano

Mb: megabites

MgCl₂: Cloreto de magnésio

ml: mililitros

NADH: nicotinamida adenosina dinucleotídeo

Nº +vo.: número positivo

Nº -vo.: número negativo

NS: Neurosífilis

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORFs: open reading frames

PBS: tampão fosfato salino

PCR-M: polymerase chain reaction-multiplex

RNA: ácido ribonucleico

Rpm: rotações por minuto

RPR: Rapid Plasma Reagin

S/SI: sem sífilis

SENS: sensibilidade

SLR: sífilis latente recente

SLTI: sífilis latente tardia ou indeterminada

SNC: sistema nervoso central

SP: sífilis primária

SS: sífilis secundária

ST: sífilis Tratada

T. pallidum: Treponema pallidum

TPHA: '*Treponema pallidum* Haemmagglutination Assay' - teste de hemaglutinação

VDRL: venereal disease research laboratory

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto Histórico

A sífilis é uma infecção causada pela bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, uma espiroqueta patogénica microaerofílica, que pode ser adquirida através de relações sexuais e transmissão vertical. Esta infecção conta com uma das mais ricas histórias conhecidas pela humanidade [4, 28, 29, 32, 44, 47], tendo tido, em séculos passados, descrições bíblicas que sugeriram ser uma doença associada a outras já existentes quer em África quer na China, sendo que na Europa as suas manifestações [95] não foram reconhecidas, até ao final do século XV [4].

Nessa altura, a doença foi denominada *morbus gallicus* " Grande Pox" ou doença Francesa" e, ao longo de vários anos, teve também outra designação tal como: venérea, (nome que se referia a Vênus, deusa grega da beleza e do amor) [4, 47, 71].

A actual designação de sífilis, adaptada genericamente a partir do século XVI, resultou da semelhança com o nome do pastor, herói de um poema em latim "Syphilus sive morbus gallicus", atribuído a Girolamo Fracastoro (1478-1553) médico e poeta veneziano, onde é relatada a descrição clínica da sífilis, doença sexualmente transmitida de que o pastor sofria [4, 36, 95, 103, 104].

Relativamente à origem da sífilis, focaram-se várias teorias, uma que defendia que a doença era uma vontade divina, tendo sido os afectados escolhidos por Deus para, a partir dessa provação, encontrarem uma recompensa no céu [48]; outras especularam que a doença teria sido transmitida aos conquistadores europeus, pelos nativos das Índias Ocidentais, tendo sido reforçada a ideia de que "a origem da sífilis seria o Novo Mundo" [36, 47].

Por outro lado, parece existirem provas convincentes de que a doença terá resultado de eventuais mutações de espiroquetas agentes da boubá, doença existente há séculos na África Central [4, 47].

Relacionada com estas provas, existem, por um lado a teoria designada por pré-colombiana, defendendo que a sífilis teria resultado de outras treponematoses já existen-

tes na Europa, e, por outro lado, a teoria colombiana que defende que a infecção teria sido transportada do Novo para o Velho Continente [71, 103, 104].

Efetivamente, as grandes epidemias europeias surgiram após o regresso de Cristóvão Colombo e seus marinheiros do Novo Mundo em 1493, tendo-se a doença disseminado por toda a Europa entre os séculos XV e XVI [29, 34].

Na altura, a sua propagação poderá ter sido facilitada pelas migrações desencadeadas pelas guerras da época e pelos movimentos das tropas [4, 47, 54].

A incidência da sífilis foi enorme em todos os estratos da sociedade e, dada a sua ampla distribuição sociogeográfica, foi sendo baptizada com diferentes designações tais como: mal francês pelos italianos e árabes, mal de Nápoles pelos franceses, os Indianos e Japoneses denominaram-na como mal português e os Turcos, de mal cristão [34].

Todas estas designações reflectem o facto de as pessoas quererem declinar a sua responsabilidade na propagação desta doença, culpando-se uns aos outros [36, 47].

Na realidade, a verdadeira origem da sífilis não é conhecida, podendo a sua forma terciária ter sido documentada por Hipócrates na Antiga Grécia, dado que na cidade grega de Metaponto aproximadamente 600 a.C., e em Pompeia foram encontradas evidências arqueológicas, nos sulcos dos dentes de crianças, provavelmente nascidas de mães com sífilis [36, 59].

Outros cientistas postulam que *T. pallidum* terá causado doenças cutâneas como a pinta e a framboésia durante a Idade Média na Europa, infecções essas que teriam sido classificadas erroneamente como lepra, e que esse microrganismo terá sofrido, durante o século XVI mutações resultando no actual agente da sífilis [54, 71].

De facto, as epidemias desta infecção surgiram repentinamente no século XVI e nessa época os europeus não apresentavam resistência à doença, exibindo sintomas abruptos e floridos, completamente diferentes dos observados presentemente [54, 59, 71].

Com o endemismo da doença, quer parasita, quer ser humano ter-se-ão adaptado um ao outro, tornando-se gradualmente a sífilis mais moderada [54, 59, 71].

Segundo esta hipótese, todas as treponematoses teriam resultado de variantes de um único agente, cuja expressão ter-se-ia modificado por factores ambientais, principalmente a temperatura [29].

Coerente com essa teoria existe a prova resultante de estudos de hibridação DNA-DNA, da estreita relação entre os *T. pallidum* subesp. *pallidum* e *T. pallidum pertenue* assim como, os estudos que demonstram a sua grande semelhança antigênica [77].

Estudos actuais de genética molecular e de imunologia com caracterização de *T. pallidum*, provavelmente irão ajudar a resolver as questões da relação entre treponemas patogénicas para os seres humanos, o que será importante para futuros programas de erradicação da sífilis e das outras treponematoses [109].

Pelo que no futuro, os cientistas continuarão a pesquisar as origens e a evolução desta infecção [69].

1.2. Características do Agente

1.2.1. Taxonomia e Classificação

O agente etiológico da sífilis, *T. pallidum* subespécie *pallidum*, é uma bactéria patogénica que pertence à ordem *Spirochaetales* da família Treponemataceae, [37] a qual inclui três géneros que transmitem doença ao homem: *Treponema*, *Leptospira* e *Borrelia* [8, 66, 74, 80, 95].

1.2.2. Características do Género *Treponema*

As bactérias do género *Treponema* apresentam parede celular de estrutura semelhante à das bactérias de coloração de Gram-negativa, caracterizando-se por serem bacilos helicoidais com corpo celular em forma de espiral envolvido por uma membrana citoplasmática e delimitado por uma membrana externa [8, 74, 95].

Entre as duas membranas existe uma camada de peptidoglicano que fornece estabilidade à estrutura, e que comporta organelas endoflagelares (órgãos de locomoção), responsáveis pela mobilidade característica em rotação e translação [5, 8, 66, 74, 95, 99, 103].

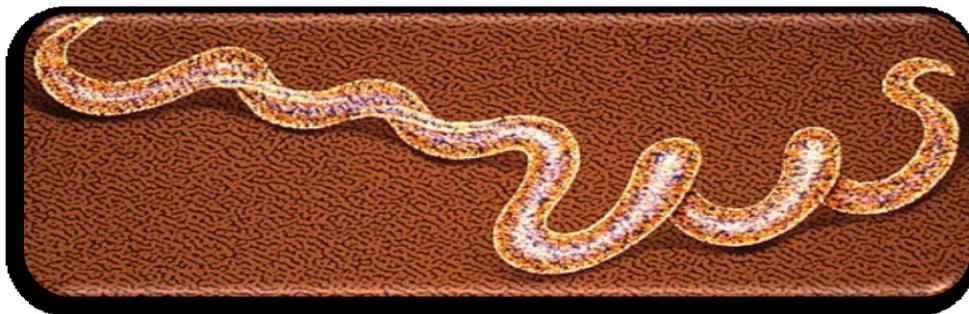


Figura 1.1. Estrutura da bactéria *T. pallidum*. Na fotografia de *Treponema pallidum*, pode-se observar a sua forma espiral, bem como as membranas internas e externas. Adaptado à *Science Photo Library* [63].

Morfologicamente apresentam 6 a 12 espiras regulares, são bactérias anaeróbias facultativas [103], com dimensão de 0,1-0,5 μ m de diâmetro por 5-15 μ m de comprimento [37, 63, 95]. Os microrganismos do género *Treponema pallidum* patogénicos apresentam desenvolvimento lento, não crescem em meios de cultura artificial, são extremamente frágeis (sensíveis à temperatura, humidade e desinfetantes) e têm, como único hospedeiro natural, o homem [31, 41, 56, 103].

Para o seu estudo têm sido utilizados animais de laboratório [32, 103]. As treponematoses são infecções causadas pelas bactérias patogénicas do género *Treponema*, que originam diferentes doenças: *T. carateum*, responsável pela pinta; *T. pallidum* subsp. *endemicum* agente do bejel ou sífilis não-venérea ou endémica; *T. pallidum* subsp. *pertenue* que origina a boubá, e *T. pallidum* subsp. *pallidum* agente da sífilis venérea e da sífilis congénita [44, 77].

Estas doenças mostram alguma sobreposição nas suas manifestações clínicas, mas tendem a ocorrer com diferentes distribuições geográficas. A sífilis é a única doença treponémica venérea, enquanto a bejel, pinta e boubá são transmitidas por contacto com lesões cutâneas ou mucosas [23, 29, 44, 72, 77, 95, 100, 106].

1.2.3. Características de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Características Morfológicas e Estruturais

O estudo ultramicroscópico de *T. pallidum* subsp. *pallidum*, permite definir na constituição deste microrganismo uma membrana interna ou citoplasmática que rodeia o corpo celular e uma membrana externa protectora. Entre uma membrana e outra, encontra-se um espaço periplasmático com uma pequena camada de peptidoglicano e os órgãos de locomoção ou flagelos. A forma espiralada deve-se à presença, no espaço periplasmático dos flagelos que se enrolam à volta do corpo celular. Estas estruturas originam movimento helicoidal típico deste microrganismo promovendo também a sua progressão em meio com viscosidade aumentada [74, 99, 103].

A membrana externa de *T. pallidum*, reveste a superfície da célula deste microrganismo e serve de barreira protectora relativamente ao meio que o envolve [66]. É uma estrutura que difere das bactérias de coloração de Gram-negativa [55] pela carência de lipopolissacarídeos (LPS) [5, 10, 31, 57, 105].

Por outro lado, a membrana citoplasmática é a estrutura que envolve o citoplasma sendo composta por numerosas lipoproteínas [8, 24], e por proteínas de ligação à penicilina (PBP). Possui também glicolípidos, cardiolipina, principal antígeno que resulta na produção dos anticorpos pesquisados pelos testes serológicos não treponémicos. Pese embora a presença destes elementos, a antigenicidade é pobre devido à arquitectura estrutural, observando-se pouca reactividade dos anticorpos contra as diversas proteínas [31, 57].

A motilidade de *T. pallidum*, acredita-se ser essencial para a patogénese da sífilis. Por analogia com outras bactérias patogénicas, é plausível que esta motilidade seja modulada por mecanismos de transdução sensorial, associados com respostas quimiotáticas para a invasão dos tecidos. Esta possibilidade levanta questões fundamentais sobre a relação entre a transdução sensorial, regulação da rotação flagelar e resposta quimiotática durante a expressão de virulência no início da infecção por *T. pallidum* [51]. A análise do genoma prevê que *T. pallidum* emprega cerca de 4,3% da sua capacidade genética para a codificação das lipoproteínas. A ausência de um sistema de cultura "in vitro" que

permita a manipulação de *T. pallidum*, contribui para a incapacidade de se poder caracterizar os aspectos funcionais das lipoproteínas da membrana. Como estratégia para investigar a biologia incomum da membrana de *T. pallidum*, tem sido tentada uma abordagem estrutura-função, com o objectivo de formular novas hipóteses sobre a potencial função das lipoproteínas treponémicas [74, 83].

Características Genómicas e Metabólicas

T. pallidum tem um genoma pequeno (1,3 Mb) com limitada capacidade metabólica [98]. A sequência completa do seu genoma foi publicada em 1998, tendo-se verificado que o DNA genómico é composto por um único cromossoma circular com 1, 138 006 pares de base (bp) que contém 1.041 sequências de codificação " Open Reading Frames " (ORFs) [40, 95]. *T. pallidum* subsp. *pallidum*, tal como outros microrganismos, possui no seu genoma, genes que realizam funções essenciais à sua sobrevivência, tais como a replicação do DNA, transcrição, a tradução do ácido ribonucleico (RNA), a eliminação do efeito tóxico do oxigénio através da enzima oxidase nicotinamida adenosina dinucleotide (NADH) [109, 114]. A produção de energia sob forma de adenosina trifosfato (ATP), está dependente da única via de glicólise [32, 74, 98]. Os mecanismos biosintéticos necessários à síntese da maioria dos nutrientes estão ausentes, *T. pallidum* retira-os do hospedeiro utilizando proteínas de transporte [92].

Características Culturais

Treponema pallidum subsp. *pallidum* é um microrganismo extremamente sensível à temperatura, oxigénio [74] e outros factores como humidade e desinfectantes [103]. Não é cultivável em meios de cultura artificiais sendo apenas, geralmente propagado "in vivo" em animais de laboratório. O coelho é geralmente o animal utilizado, por nele a infecção se desenvolver de modo semelhante à infecção humana [16, 55].

O método usado para manter e reproduzir o microrganismo para estudos experimentais em laboratório, tem sido o de inoculação intra testicular nesse animal, da estirpe de Nichols, estirpe de *T. pallidum* isolada de uma amostra de liquor de um doente com neurosífilis [31, 56, 103].

1.3. Patogenicidade e Imunidade

As bactérias, no sentido de se adaptarem as condições de mudanças do seu ambiente, são capazes de modular a expressão de genes, aumentando a sua sobrevivência e causando doença no hospedeiro. Para tal regulam os seus factores de virulência respondendo ao "stress", pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, osmolaridade, CO₂ e outros factores tais como fosfato, cálcio ou ferro [37, 74].

A ausência de técnicas de cultura "in vitro" para *T. pallidum*, tornam extremamente difícil identificar os factores de virulência ou de regulação envolvidos na patogénese da sífilis [30, 98]. A sobrevivência de um microrganismo num hospedeiro está relacionada com a capacidade deste aplicar os seus mecanismos de virulência e de defesa, podendo a sua interacção variar de hospedeiro para hospedeiro. *T. pallidum* possui uma membrana externa com 100 vezes menos proteínas do que as membranas externas de outras bactérias [8].

Após a sequência genómica de *T. pallidum* subsp. *pallidum* (estirpe de Nichols), a pesquisa sobre a sífilis centrou-se nos genes Tpr (*T. pallidum* repeat) [43], uma família de 12 genes relacionados, que se prevê que codificam proteínas de membrana externa e que parecem constituir um sistema de variação antigénica [43, 75]. Até agora, não foi identificado em *T. pallidum* nenhum antígeno de superfície, devido à impossibilidade de ser cultivado em meios artificiais, à extrema fragilidade da sua membrana externa e à baixa densidade de proteínas integrais no seu compartimento celular [30, 43].

As principais determinantes de virulência e protectores do agente etiológico da sífilis, ainda precisam de ser elucidados em grande parte devido como já referido, à natureza não cultivável da espiroqueta [32, 64, 83, 110].

Estudos efectuados até ao presente, indicam que a membrana externa deste microrganismo é relativamente deficiente em proteínas e com estrutura antigénica inerte o que pode contribuir significativamente para a capacidade do patógeno em evadir-se à resposta imune do hospedeiro; uma vez que esses antígenos são, entre as proteínas, os primeiros a interagir no hospedeiro infectado [25, 110].

Desta incerteza quanto ao que origina a virulência de *T. pallidum*, até porque se apresenta morfológicamente semelhante a outros treponemas não virulentos, e porque o seu estudo tem sido difícil, há necessidade de optimização de técnicas para o isolamento da membrana externa de *T. pallidum*, de modo a verificar se esta pode induzir imunidade protectora que poderá servir para o desenvolvimento de uma vacina contra a sífilis [41, 57, 65]. Um problema relativo à resposta imune do hospedeiro à infecção sífilítica, relaciona-se com o mecanismo pelo qual o sistema imunológico reconhece inicialmente, a presença de *T. pallidum* no local de inoculação [101].

A incapacidade da cultura de *T. pallidum* em meios artificiais e a escassez de informação sobre os factores que influenciam a sua relação com o hospedeiro, durante a infecção sífilítica, têm induzido à análise das proteínas da membrana, com o objectivo de verificar os seus potenciais factores de virulência. Esta análise tem contribuído para a compreensão da estrutura e função das proteínas de membrana de *T. pallidum* as quais poderão estar relacionadas com a ligação patógeno-hospedeiro resultando na virulência deste microrganismo [5, 32, 41, 75, 83, 93].

O isolamento de lipoproteínas que constituem a membrana de *T. pallidum*, levou a investigar a sua importância na fisiologia e ultra-estrutura deste microrganismo. Essas lipoproteínas de membrana parecem ser específicas de *T. pallidum*. Em outras bactérias, têm importância como factor de virulência, componentes modulares do ATP, transportadores, enzimas, receptores, alvos de protecção imunológica. Estudos in vitro mostraram que *T. pallidum* adere às superfícies epiteliais, atravessa a barreira de tecido, e entra na circulação, invadindo os tecidos entre as células endoteliais, resultando na disseminação bacteriana generalizada, que estabelece a infecção [5, 13, 30].

A cronicidade da infecção pode estar relacionada com a propriedade da membrana externa de *T. pallidum*, conter menos proteínas do que as membranas externas típicas das bactérias gram-negativas. A interacção entre este patógeno e o hospedeiro lidera no estabelecimento da infecção, e geralmente ocorre por intermédio das ligações com as moléculas de superfície. Além disso, apenas um número muito pequeno de antígenos de superfície de *T. pallidum* são potenciais determinantes de virulência [7, 8].

1.4. Transmissão e Epidemiologia

A sífilis é uma infecção com distribuição mundial, atingindo sobretudo a população sexualmente activa. Apesar da existência de antibioterapia acessível com alta eficácia para o tratamento desta infecção, continua a ser um grande problema para as autoridades sanitárias [27].

A infecção pode ser adquirida através de relações sexuais (vaginal, oral ou anal) e/ou por transmissão vertical (da mulher grávida para o feto) [44, 74, 77, 79] e, ocasionalmente, por transfusão com sangue contaminado, embora actualmente com menor probabilidade por este ser testado antes de transfundido [44].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, aproximadamente 12 milhões de novos casos de sífilis ocorrem anualmente em todo o mundo, dos quais cerca de 4 milhões na África subsahariana [23, 85, 90, 95, 114]. A prevalência e incidência da sífilis variam consoante as áreas geográficas, predominando na população sexualmente activa, se bem que em muitos países a falta de dados não permita qualquer avaliação [109].

A nível mundial, a mais elevada prevalência da sífilis regista-se conforme já referido, na África subsahariana, seguida da América do Sul e Central e depois na Europa e na América do Norte [103].

No século passado (XX), foram efectuados vários esforços para eliminar esta infecção, tendo falhado por imprevistos sociais e limitações de recursos, contribuindo, desta forma, para a persistência da doença, a qual continua a ser um problema de saúde pública [47, 57, 95, 108].

A incidência mais elevada de infecção ocorreu antes da Segunda Guerra Mundial, após a qual se verificou uma diminuição significativa coincidente com a disponibilidade do fármaco penicilina (descoberta nessa altura) utilizado no seu tratamento levando as autoridades sanitárias a presumir ter-se vencido a doença num curto espaço de tempo [15, 16, 20, 48].

Contudo, tal não aconteceu e, contrariamente a isso, a partir da década de 1960-1970, a infecção ressurgiu em muitos países; a prevalência de infecção aumentou gradualmente com o aparecimento do vírus de imunodeficiência humana (VIH) na década de 1980, tendo subido para os níveis mais elevados desde os da Segunda Guerra Mundial [4, 22, 57, 103]. Na década de 1990-2000 ocorreu uma epidemia de sífilis entre os indivíduos homossexuais (HSH), em paralelo com os heterossexuais [7, 11, 20, 21, 41, 95].

No que se refere a Angola não se encontraram dados globais relacionados com sífilis, mas informações particulares referem haver uma maior prevalência nas províncias do centro, sul e leste do país, nomeadamente Luanda com (5.4%), Lunda-Sul (13%), Huíla (7%) e Benguela (4.7%) [60, 62].

1.5. Evolução e Manifestações Clínicas da Doença

A sífilis quando não tratada torna-se numa doença crónica, que progride através de múltiplos estádios, com variação nas manifestações clínicas [15, 53, 55, 95, 110], classificadas como: sífilis primária, secundária, latente e terciária [11, 44, 105]. A delimitação das fases é convencional e varia conforme as escolas médicas. Nos Estados Unidos da América (E.U.A), consideraram como período recente apenas o primeiro ano de evolução da doença, seguindo os critérios utilizados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), no entanto, na Europa, o período recente abrange os dois primeiros anos da doença de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) [42, 103].

A sífilis adquirida e não tratada progride por estádios clínicos que se iniciam pelo contacto da espiroqueta no local da inoculação (período de incubação assintomático) seguido do estágio primário com sintomatologia localizada à região da inoculação. A este e após período variável segue-se o estágio secundário relacionado com a disseminação da infecção, que evolui para uma fase de latência na qual, aparentemente, não há nenhuma manifestação clínica mas que, posteriormente, pode evoluir para o estágio terciário com diversas manifestações clínicas [27, 28, 37, 44, 71, 103].



Figura 1.2. Imagem de lesão única no dedo no local da inoculação de sífilis (Infecção primária). Adaptado à derme.org. [61].

1.5.1. Estádio Primário

Este estágio inicia-se pela inoculação de *T. pallidum* através do contacto da pele ou mucosas com lesões infecciosas [94]. No local de inoculação desenvolve-se o cancro duro que se inicia por uma pequena zona vermelha saliente (pápula), que em breve progride para ferida aberta (úlcer) indolor. Em regra, apresenta-se como uma úlcera única, mas, por vezes, podem coexistir várias úlceras sobretudo em doentes co-infectados com HIV [6, 61].

A úlcera não sangra, mas liberta ao toque um líquido claro altamente infeccioso. O cancro com mais ou menos 0,5 a 1,0 cm de diâmetro [103] afecta geralmente os órgãos genitais externos, mas também pode aparecer noutros locais tais como: ânus, recto, lábios, língua, garganta, colo uterino, dedos ou, raramente noutras partes do corpo [5].

Os gânglios linfáticos próximos, costumam aumentar de volume mas permanecem indolores. Como a lesão causa poucos sintomas, é habitualmente ignorada [100].

Em cerca de metade das mulheres e um terço dos homens, infectados estas lesões podem mesmo passar despercebidas [4, 37, 64, 79]. É a partir da lesão primária, local da multiplicação inicial do patógeno, que se origina a disseminação hematogénea do microrganismo pela invasão intercelular do endotélio. Estas lesões curam-se espontaneamente, mesmo sem tratamento em 10 a 14 dias, sentindo-se o indivíduo afectado perfeitamente bem [42, 44, 95].

A este estágio, segue-se um período de incubação em média de 3-4 semanas pós-infecção, no qual não há nenhuma ocorrência de manifestação clínica ou apenas a presença de uma hipertermia ligeira [79, 103].

1.5.2. Estádio Secundário

Os indivíduos com lesões primárias não tratadas, podem, após algumas semanas ou meses, desenvolver doença sistémica evoluindo para a fase secundária. Esta caracteriza-se por uma erupção na pele, altamente variável podendo ser confundida com qualquer outra doença dermatológica, como psoríase, pitiríase rósea e exantema viral [7, 53]. As lesões secundárias são em forma de pápulas, de cor rosada, e surgem no tronco, membros, palmas das mãos e plantas dos pés [6, 9, 37].

No início deste estágio as manifestações podem ser generalizadas, muitas vezes aparatosas, com hipertermia, artralgia, sudação profusa, prostração, anorexia, emagrecimento [103] e associar-se a erupção a nível da pele, que pode atingir as mucosas. Esta é, a fase com maiores manifestações clínicas, provocadas pela disseminação generalizada da infecção resultante da libertação e entrada na circulação de treponemas [44], a qual afecta todo o organismo e pode surgir 6 a 12 semanas após a infecção [11, 28, 120].

Durante o secundarismo, cerca de 25% dos infectados podem ainda ter úlcera em fase de cura (mesmo sem tratamento). Ocasionalmente, surgem formações salientes (*condilomas planos*) nas zonas limitantes entre a pele e a membrana mucosa, como por exemplo, na parte interna dos lábios, da vulva e nas zonas húmidas da pele. Estas lesões infecciosas podem achatar-se e adoptar uma cor rosa-escura ou cinzenta [6].

Outras manifestações que se podem relacionar com a infecção são: a inflamação dos gânglios linfáticos cervicais, axilares, inguinais e epitrocleares assim como o aparecimento de lesões nodulares nas palmas das mãos e planta dos pés [7, 9], febre baixa, cefaleias, mal-estar, náuseas, vómitos, fadiga, manchas na boca que muitas vezes são identificadas como úlceras aftosas ou outras, condilomas genitais e, em menor percentagem, casos de manifestações renais e oculares [121].

As áreas pilosas, podem também, ser atingidas com o aparecimento de alopecia [6, 7, 34, 53, 79, 89, 114], manifestações articulares de intensidade variável a nível dos pés, punhos, cotovelos e joelhos são também referidas por alguns doentes [97].

Outros sintomas menos frequentes são: uveíte anterior, retinite, envolvimento de nervos cranianos, meningite, laringite, gastrite, hepatoesplenomegalia, hepatite, glomerulone-

frite e periostite. Relacionadas com todas estas manifestações, a sífilis foi apelidada de "a grande imitadora", pela sua capacidade em "imitar" uma variedade de outras doenças, sendo identificada através dos sinais e sintomas característicos da sífilis secundária e pelo difícil diagnóstico [7, 9, 28, 56, 95].

Embora o espectro de manifestações clínicas não tenha mudado substancialmente, o clínico deve manter um índice elevado de suspeita e efectuar a confirmação pelos testes serológicos [1, 7, 9, 56, 114, 122]. Durante este período, a doença é, tal como no período primário, altamente contagiosa [37].

1.5.3. Estádio Latente

Mesmo sem tratamento, o doente infectado pode recuperar dos sintomas do estágio primário e secundário e a infecção entra numa fase assintomática, sendo apenas evidenciada pela reactividade dos testes serológicos [44].

Esta fase pode durar anos ou mesmo o resto da vida do indivíduo, sendo subdividida em fase de latência precoce se a infecção tiver sido adquirida no prazo de dois anos anteriores ao diagnóstico, e tardia se adquirida há mais de dois anos [7]. Ao longo do estágio de latência precoce, podem surgir recaídas e, o doente tornar-se infeccioso. Mais de 90% das recaídas ocorrem no primeiro ano [73].

1.5.4. Estádio Terciário

Uma minoria dos doentes com sífilis latente pode evoluir para a fase tardia (terciária), na qual a doença apresenta manifestações devastadoras como: sífilis cardiovascular, na qual a lesão da aorta é a manifestação mais comum [26, 107].

Os sintomas deste estágio surgem tardiamente, cerca de 20 a 40 anos após a infecção inicial [74], com excepção dos doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana-HIV, nos quais a evolução natural da sífilis pode ser mais rápida resultando no aparecimento mais precoce da neurosífilis [122]. Os treponemas podem invadir qualquer órgão incluindo o sistema cardiovascular, neurológico e ósseo; originando nas estruturas de suporte o aparecimento de infiltrado ou destruição, com formação de lesões granulomatosas ou úlceras [4, 44, 47, 121].

As lesões cutâneas das mucosas mais características são os tubérculos (nódulos dérmicos) e gomas (subcutâneos) cuja cura resulta em cicatrizes [44, 122].

Os efeitos mais graves de sífilis não tratada, são os que envolvem o sistema nervoso central e periférico originando neurosífilis [74] e a sífilis cardiovascular. Este é caracterizado pelo desenvolvimento de insuficiência da válvula aórtica, com aneurisma da aorta, originando dor torácica, insuficiência cardíaca, dispneia e possível morte [11, 44, 74, 107].

As complicações neurológicas tardias ocorrem geralmente 5 a 10 anos após a infecção inicial não tratada, devido à invasão precoce do sistema nervoso central (SNC) que pode evoluir para sífilis meningovascular, com complicações como acidente vascular cerebral (AVC) [121].

Para além disso, os indivíduos podem ter vertigens, insónias, alterações de personalidade; perdas de consciência, convulsões e evolução para paralisia geral com instabilidade emocional, perda de memória, alucinações e hiperactividade dos reflexos [74].

Quando há envolvimento da coluna posterior, da medula espinal e dos gânglios da raiz dorsal surge tabes dorsalis, com ataxia sensitiva dos membros inferiores, parestesia, vômitos de início súbito ou dor abdominal; perda de sensações de dor, temperatura profusa e também podem ocorrer lesões do nervo óptico [74, 122].

A neurosífilis é diagnosticada em cerca de dez por centos dos doentes com sífilis não tratada, podendo-se desenvolver em qualquer dos estádios da infecção por *T. pallidum*. Neurosífilis assintomática é a apresentação mais comum, resultante da invasão do sistema nervoso central e deve-se ter presente a suspeita deste diagnóstico nos doentes que já tenham sido portadores de neurosífilis, ou aos que não responderam ao tratamento da sífilis primária, secundária ou latente, assim como nos indivíduos infectados pelo HIV ou outras condições que possam comprometer o sistema imunológico [11].

Por vezes a nível do SNC, surgem gomas granulomatosas, que são clinicamente significativas porque causam destruição local. Estas lesões podem ainda afectar qualquer sistema orgânico, ocorrendo principalmente a nível da pele, mucosas, ossos [95], embora

também possam ocorrer no fígado, coração, cérebro, estômago e trato respiratório superior [74, 105].

1.5.5. Sífilis Congénita

A sífilis congénita resulta da transmissão de *T. pallidum* da mulher grávida para o feto, quer através da placenta, quer por contacto com as lesões infecciosas durante o parto. A transmissão vertical ocorre mais frequentemente durante a sífilis primária ou secundária, o que implica dizer que quanto mais precoce for a infecção da mãe, maior probabilidade há de transmissão ao filho. O risco de transmissão transplacentaria, diminui após 4 anos de infecção, mesmo quando não tratada [74, 120].

Tal como a doença sífilítica adquirida do adulto, a sífilis congénita é geralmente subdividida em fases: a precoce, na qual as manifestações aparecem nos primeiros dois anos de vida, e a tardia após este período. As manifestações precoces, podem estar presentes na altura do nascimento, ou tornarem-se evidentes nessa altura, ou ainda, da segunda à décima semana pós-parto, sendo o sintoma mais comumente observado o da lesão da mucosa nasal, com rinorreia purulenta por vezes com sangue, resultante de elevada espiroquetemia [74].

A infecção congénita pode produzir no feto ou na criança lesões de diversos graus e natureza distinta podendo originar morte intra uterina, e/ ou aborto espontâneo, parto prematuro no caso de infecção precoce na grávida, ou ainda nado morto de termo quando a mãe tem uma infecção tardia [2, 37, 45]. As crianças que nascem com sífilis congénita e sobrevivem, podem apresentar baixo peso, febre, erupção cutânea, cegueira, debilidade no desenvolvimento, surdez, [38, 81] descamação da pele que abrange as regiões palmar, plantar, formação de *condiloma plano*, lesões das mucosas, anemia, hepatoesplenomegalia, insuficiência renal e icterícia. A osteocondrite dos ossos longos revelada pela dor e falta de movimento das extremidades dos membros superiores e inferiores (pseudoparalísia) é uma lesão típica da infecção precoce [2, 27, 38, 74, 95].

Outras alterações típicas são: o aparecimento dos dentes incisivos superiores entalhados em Hutchinson, comprometimento da audição, neurosífilis, artropatia e nariz em forma de sela [29, 37, 61, 67, 74].



Figura 1.3. Imagem de má formação dentária típica de lesão congênita. Adaptado à Cornell University Medical College [61].

1.6. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial de infecção por *T. pallidum* é de grande importância sobretudo nas situações de diagnóstico clínico mais difícil. As diversas técnicas passíveis de serem utilizadas apresentam eficácia diferente consoante o estágio da infecção (sintomático ou assintomático) [57] e, até hoje, não existe um único teste que permita o diagnóstico eficaz em todos os estádios [37]. Assim torna-se necessário, para o diagnóstico desta infecção, a associação do exame clínico com os dados laboratoriais [12, 56, 68].

No diagnóstico laboratorial são utilizados métodos que incluem a detecção de *T. pallidum* por microscopia [18, 56] ou a pesquisa do seu DNA ou métodos indirectos que pesquisam anticorpos anti-*T. pallidum* [39, 122].

1.6.1. Métodos de Detecção Directa de *Treponema pallidum*

1.6.1.1. Métodos Microscópicos

A detecção directa de *T. pallidum* por microscopia de campo escuro é a técnica mais específica para o diagnóstico de sífilis, quando [11] presentes lesões de sífilis primária, secundária ou congénita, sendo possível observar e identificar o microrganismo, de acordo com as suas características, de morfologia em espiral, com espiras uniformes e mobilidade de extensão em torno do eixo longitudinal tipo saca-rolhas [37, 57, 122]. Porque a viabilidade de treponemas é essencial para a identificação, amostra deve ser observada de imediato, logo após a colheita, visto o microrganismo não sobreviver por muito tempo fora do seu habitat [74].

No entanto, esta técnica possui limitações devido à sua baixa sensibilidade [12], sendo necessário três colheitas feitas em dias diferentes, para se considerar um resultado negativo. A sua precisão é limitada pela experiência do microscopista que realiza o teste, e pela quantidade de treponemas existentes na amostra [11], não sendo um teste útil, após cura das lesões da sífilis primária e/ou secundária [57, 58].

Uma outra técnica que permite a detecção de *T. pallidum* em amostras de lesões e de fluídos orgânicos, é a técnica de imunofluorescência directa (Direct Fluorescent Antibody *Treponema pallidum*), que pode substituir a microscopia de campo escuro [105]. Nesta, os treponemas eventualmente presentes na amostra são identificados pela utilização de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, marcados por isotiocianato de fluoresceína (FITC) [103], sendo observados ao microscópio de fluorescência. Esta técnica tem a vantagem de apresentar maior sensibilidade e especificidade do que a microscopia de campo escuro [37, 44].

1.6.1.2. Métodos de Biologia Molecular

Dos vários métodos de biologia molecular existentes, o que tem sido mais utilizado para o diagnóstico laboratorial de uma doença infecciosa é o da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica consiste na síntese de um fragmento específico de DNA através de ciclos sucessivos de repetição, resultando na multiplicação exponencial da mesma até que quantidade suficiente de produto amplificado se acumule podendo ser detectado. Deste modo, uma única molécula de DNA pode originar cerca de um bilhão de cópias após 30 ciclos de replicação exponencial, tornando assim este ensaio altamente sensível [15, 56, 72].

A técnica comporta três fases: inicialmente uma fase de desnaturação com separação das cadeias de DNA, segue-se a fase de ligação das sequências iniciadoras (*primers*) às cadeias que contêm as sequências alvo e por último a extensão com produção de novas cadeias de DNA complementar [56, 109].

Devido à indisponibilidade de um meio de cultura de rotina para isolamento e identificação de *T. pallidum*, a técnica de PCR aplicada para esse fim demonstrou ser de um grande potencial, pela sua elevada sensibilidade e especificidade, além de poder ser uti-

lizada em diversos materiais biológicos nomeadamente, em fluídos (soro, sangue, liquor, liquido amniótico) e tecidos; inclusive, em cortes de tecidos em parafina. Não é actualmente uma técnica usada por rotina, pelas dificuldades técnicas e alto custo, mas é provável que, no futuro, venha a ter ampla utilização [103, 109].

É uma técnica que pode ser útil em dois aspectos: primeiro, permite a realização de estudos para diagnosticar a infecção por *T. pallidum* por intermédio da identificação de sequência específica do seu DNA; segundo, permite efectuar estudos epidemiológicos através da subtipagem genómica de *T. pallidum* subsp. *pallidum* [109].

Diversos autores têm descrito técnicas de PCR como método de identificação de *T. pallidum*, sendo que a maioria deles utilizam como alvos de amplificação genes que codificam lipoproteínas de membrana (sobretudo para a lipoproteína de 47 kDa) por serem genes geneticamente conservados. Um outro gene alvo de *T. pallidum* que tem sido utilizado para este tipo de identificação é o gene *polA*. Este codifica para uma proteína enzimática, a DNA polimerase I, a qual em *T. pallidum* subsp. *pallidum* apresenta características específicas únicas (elevado conteúdo em cisteína e quatro inserções no domínio 3' - 5' de exonucleose) o que torna a técnica mais sensível e específica. No que refere o gene da lipoproteína de 47 kDa (Tp47) [24, 31, 117] os *primers* mais utilizados têm sido K03A (5'-GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3') e K04A (5'-AGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3') que amplificam um fragmento de 261 pb (base pair) [12, 90].

Quanto ao gene da DNA polimerase I (*pol A*) o conjunto de *primers* descrito foi *polA-F* (5'-AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3') e *PolA-R* (5'-CACAGTGCTCAAAAACGCGTGACG-3') [102, 109], que amplificam um fragmento de 378 pb. As diferentes técnicas de PCR descritas, têm sido aplicadas no estudo de diferentes tipos de amostras de (exsudado de lesões, sangue, plasma, soro, liquor) de doentes em diferentes estádios de infecção, e, embora a sua especificidade seja elevada em qualquer dessas situações, a sensibilidade varia com o tipo de amostra e o estágio da infecção [16, 42, 77, 90].

Actualmente a técnica de PCR em tempo real tem também sido estudada como técnica à utilizar no diagnóstico laboratorial de infecção sífilítica. O fundamento deste método é semelhante ao da técnica de PCR com a diferença na detecção dos fragmentos amplifi-

cados, a qual é efectuada pela utilização de sondas de hibridação marcadas com fluorómetros [15, 27].

Esta metodologia permite amplificação e detecção de DNA em uma única etapa diminuindo a possibilidade de contaminação, permitindo monitorizar a quantidade de produto formado ao longo da reacção. Diversos investigadores têm referenciado este método, tendo demonstrado apresentar uma maior sensibilidade do que o método do PCR convencional [109].

1.6.2. Métodos Serológicos

Os testes serológicos são o método mais utilizado para diagnóstico indirecto da sífilis [17, 39, 73, 122], e podem ser divididos em dois grupos: os testes não treponémicos e os testes treponémicos [17, 35, 42]. Os testes não treponémicos são adequados para o rastreio e quando reactivos, devem ser confirmados com um teste treponémico específico a fim de evitar resultados de falsa reactividade [11, 118, 122].

Desde há alguns anos, e principalmente na Europa e Estados Unidos, para o diagnóstico de sífilis, alguns laboratórios de análises clínicas têm utilizado o teste treponémico de tipo imunoenzimático (EIA) [11, 34, 108]. O rastreio desta infecção e todas as amostras consideradas reactivas pelo teste atrás mencionado, são analisadas com um teste não treponémico [42, 68, 108, 121].

Esta estratégia identifica tanto as pessoas correctamente ou incorrectamente tratadas, com infecção passada como as com infecção activa. Não sendo um teste de execução rápida exige também a acumulação de amostras; é de custos elevados tornando-se impraticável a sua execução em muitos laboratórios [35]. Na prática, é usual efectuar-se testes não treponémicos para o rastreio, seguido dos testes treponémicos para confirmação dos resultados [78, 79, 82].

Para esse fim, os testes mais utilizados são o teste *Rapid Plasma Reagin* (RPR) e o *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL), que pesquisam anticorpos anticardiolipina. A reactividade destes, deve ser certificada por testes com antígenos treponémicos (específicos) que identifiquem anticorpos anti-*T. pallidum*, como os testes *T. palli-*

dum Haemmagglutination Assay (TPHA) e o teste de imunofluorescência indirecta (FTA-Abs) [36, 78, 79, 84, 87, 116].

Testes Serológicos Não-Específicos

Todos os testes não treponémicos, pesquisam anticorpos de tipo imunoglobulinas G e M (IgG/IgM), formados pelo hospedeiro em resposta ao material fosfolipídico libertado pelas células destruídas, sobretudo nas fases precoces da infecção [100] assim como contra a cardiolipina e substâncias semelhantes a proteínas, componentes estruturais libertados pelas treponemas [16]. Os testes não treponémicos mais usados são: o *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e o *Rapid Plasma Reagin* (RPR) que utilizam como antigénio uma solução alcoólica de colesterol, cardiolipina e lecitina [17, 44, 73, 84, 88, 99].

São testes geralmente utilizados para o rastreio de infecção e permitem monitorizar o curso da doença, durante e após o tratamento. O teste VDRL, é um teste de microfloculação, cujo resultado é obtido por leitura microscópica, tendo como desvantagem a necessidade de preparação diária da suspensão de antigénio, que apenas pode ser utilizado no próprio dia [73, 100].

O teste RPR, utiliza a mesma suspensão de antígeno do VDRL, adicionada de partículas de carvão que permitem a visualização da reacção do teste macroscopicamente [44, 100]. Apresenta a vantagem de, a suspensão de antígeno estar sempre pronta, sendo um dos testes mais utilizado para o diagnóstico da sífilis [82, 100, 118]. Qualquer um destes testes é de execução rápida, permitem obter resultado no próprio dia, e podem ser efectuados em laboratórios menos equipados, tendo também um custo acessível. As suas principais limitações são a pouca especificidade, sendo um problema quando são utilizados para rastrear populações com baixa prevalência de sífilis. Podem apresentar resultados falsos-positivos devido a reacções cruzadas resultantes de outras infecções treponémicas, de infecções virais, de causas imunológicas ou de gravidez [7, 84].

Podem também ocorrer falsos negativos, devido à interferência de altas concentrações de anticorpos no equilíbrio da reacção antigénio-anticorpo, aquando do estudo de uma amostra (fenómeno prozona), não ocorrendo flocculação [4, 34, 44, 100, 114].

Por isso, um teste não treponémico reactivo deve ser confirmado com um teste treponémico. Quando um teste não treponémico é reactivo no rastreio, deve ser efectuada a titulação desse soro, pois, esta fornece um índice de actividade de infecção, sendo também utilizado para monitorar a resposta ao tratamento [7].

O título obtido permite a criação de uma referência, na avaliação da infecção activa e na resposta ao tratamento, assim como a detecção de reinfeção ou recaída. No entanto, os valores numéricos obtidos podem variar entre o tipo de testes e o laboratório pelo que, quando um doente está a ser seguido com títulos em série, deve, de preferência, efectuar o mesmo teste no mesmo laboratório [100].

Testes Serológicos Específicos

Enquanto muitos laboratórios adoptaram uma abordagem convencional no estudo serológico de sífilis, ou seja, rastreio com um teste não-treponémico, seguido da confirmação da reactividade com um teste treponémico; muitos outros têm adoptado uma abordagem em que utilizam de imediato os dois tipos [35, 42, 108, 121]. Os testes treponémicos utilizam como antigénio *T. pallidum* ou componentes deste microrganismo, sendo os mais usados: o teste de hemaglutinação (TPHA) e o teste de imunofluorescência indirecta (FTA-Abs) e actualmente os testes imunoenzimáticos [36, 37, 68, 78, 93].

O teste TPHA é um teste de aglutinação, que utiliza eritrócitos de peru ou galinha, sensibilizados com antígeno de *T. pallidum*, o qual irá ligar-se ao anticorpo específico se presente no soro do doente. É de fácil execução, assim como de leitura e de interpretação do resultado [37, 44]. O teste FTA-Abs utiliza como antigénio, a estirpe de Nichol, de *T. pallidum* inactivado, fixado em lâmina. Os anticorpos inespecíficos são removidos da amostra do doente por absorção com extractos de *Treponema Reiter*. O soro é colocado em contacto com antígeno fixado na lâmina sendo a reacção posteriormente evidenciada por um anti-anticorpo humano conjugado com isocianato de fluoresceína, que permite ser visualizado no microscópio de fluorescência. Este método, requer um observador experiente e permite efectuar pesquisa de imunoglobulinas G e M (IgG e IgM) específicas em separado [37].

Teste imunoenzimático (EIA)

As técnicas imunoenzimáticas começaram por utilizar como antígeno, extractos de *T. pallidum* e mais tarde com o desenvolvimento de antígenos clonados, proteínas de membrana, como TpN 15; TpN 17 ou TpN 47, são geralmente as utilizadas [16, 35, 50].

De um modo geral estes testes utilizam microplacas revestidas com o antígeno (extracto *T. pallidum* ou proteínas recombinantes). O soro é colocado em contacto com esse antígeno sendo a presença de anticorpos evidenciada pela utilização de um anticorpo anti-humano (anti IgG ou anti IgM) marcado com enzima ou biotina, os quais ao reagirem com um substrato, produzem uma reacção colorimétrica observável e lida no espectrofotómetro. Estas técnicas apresentam uma vantagem de serem automatizáveis, permitindo o estudo de grande número de amostras em simultâneo, e elimina a leitura subjectiva das técnicas de hemaglutinação e de imunofluorescência, uma vez que é efectuada em espectrofotómetro [11, 35, 59].

Teste de Western blot

Os métodos imunoblot devido a sua alta sensibilidade, simplicidade e objectividade têm sido propostos como técnicas de confirmação para infecção a *T. pallidum*, como é o caso das actuais normas europeias [16, 42, 84]. Para esta técnica tem sido utilizadas proteínas recombinantes (TpN 47; TpN 17; TpN 15; TmpA) transferidas para uma membrana de nitrocelulose a qual é, em seguida cortada em tiras que são incubadas com o soro a estudar. A presença de anticorpos é detectado pela utilização de um anticorpo anti-humano marcado com uma enzima, ao qual se segue a adição de substrato para visualização da reacção. Quando presentes anticorpos anti- *T. pallidum* há formação da reacção colorida com o aparecimento de bandas [16, 41, 119, 121]. De um modo geral os autores (Norris *et al.* 1993 e George *et al.* 1998), concordam que a presença de anticorpos dirigidos a três proteínas são necessários para considerar o soro reactivo [16].

Testes rápidos para pesquisa de anticorpos anti-*T. pallidum*.

Desde há alguns anos têm sido desenvolvidos e avaliados testes designados como testes rápidos para o diagnóstico da sífilis. São testes de execução simples e leitura fácil que podem ser utilizados em instituições de saúde primária, carecendo de um treino mínimo

do pessoal técnico e não requerendo equipamento especializado. Os testes rápidos utilizam como antígeno, proteínas recombinantes de *T. pallidum* (TpN 47; TpN 17; TpN 15; TmpA), estas associadas ou isoladas, podendo ser ligadas a um suporte sólido constituindo um ensaio de imunocromatografia ou a partículas de latex, formando um teste de aglutinação. Estes podem ser utilizados para a pesquisa de anticorpos no plasma, soro ou sangue total. A leitura é feita em 5 a 20 minutos, sendo vantajosos em relação o uso de outros testes, não só pela rapidez de resultado como também são melhor adequados para utilização em áreas com poucos recursos [16, 34, 68, 77, 79, 100].

1.7. Tratamento

Com a propagação da doença e as grandes epidemias em diferentes estratos da população, ao longo dos séculos foram tentados vários tratamentos, mas sem sucesso. Durante toda a era moderna o tratamento da sífilis foi de tipo empírico, tendo-se efectuado muitas pesquisas, observações e experiências para obter conhecimentos mais avançados tanto sobre a história natural da sífilis, como do seu tratamento. Para tal, foram experimentados vários fármacos como: mercúrio, bismuto e arsénio, substâncias que pareciam ser capazes de produzir resultados no tratamento desta doença. O mercúrio é um medicamento conhecido, desde a Idade Média, sendo usado pelos médicos árabes em preparações para curativos e doenças da pele provocadas por parasitas. Foi descrito como terapêutica para a sífilis por Abdel Karim em meados do século XVI [46, 88, 107].

No século XVIII e início do século XIX, o médico Ahmed Dahmani apresentou-o pela primeira vez para o tratamento da sífilis. O mercúrio é um agente de acção lenta impedindo a proliferação de *T. pallidum* em vez de o destruir, levando a uma sintomatologia menos severa. No início do século XX, a descoberta de derivados de arsénico levaram a uma esperança real na tentativa de limitar a propagação da sífilis, sendo este utilizado como complemento ao mercúrio no tratamento desta infecção. A fim de complementar a acção do arsénio, foram também utilizados compostos como iodetos, ultravioleta e ferro [48, 115].

Nesta luta para alcançar um tratamento adequado, várias experiências foram postas em prática: sais de ouro, derivados de zinco, a malária e proteínas; mas sem muito sucesso. Ehrlich, médico alemão, depois de longas e frequentes experiências, descobriu o salvar-

san ou 606, o qual demonstrou ter uma eficácia superior a todos os outros produtos anteriormente utilizados [48, 49].

Na década de 1940, a descoberta da penicilina veio mudar a história da sífilis, da medicina e até mesmo da humanidade. Este medicamento inaugurou uma nova era, a partir da qual, a humanidade encontrou solução para os problemas de doenças infecciosas: a era dos antibióticos. A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser utilizado e permanece até hoje entre os melhores a ser utilizado na terapêutica da sífilis. Foi em 1928-1929, no Hospital de St. Mary's, em Londres, que Fleming descobriu, acidentalmente, esta droga quando observou no seu laboratório, uma cultura com colônias de bactérias (*Staphylococcus*) contaminada por um fungo que causou lise dessas colônias [49].

Esse fenômeno, que o surpreendeu, incentivou-o a outras experiências, levando-o à demonstração de que os fungos segregam uma substância capaz de matar bactérias a qual designou por penicilina [48, 111].

A penicilina não foi utilizada de imediato, tendo sido necessários cerca de 10 anos para o seu estudo e ser elaborada uma fórmula a ser utilizada na prática clínica [48, 49, 79, 87].

O tratamento preferencial para todas as fases da sífilis é a penicilina, e, apesar do seu uso desde há décadas, a resistência de *T. pallidum* a este antibiótico ainda não foi detectada. Em casos de hipersensibilidade à penicilina, as alternativas podem incluir a tetraciclina ou doxiciclina, eritromicina ou azitromicina e ceftriaxona. Entre essas alternativas, a azitromicina tem a vantagem de ser utilizada numa única dose oral, e permitir aos doentes levar a terapêutica aos seus parceiros sexuais [24, 31, 39, 42, 44, 46, 57, 87, 88, 111, 115, 121].

No entanto, têm sido relatados casos de resistência a este fármaco. No início da terapêutica com a penicilina, alguns doentes podem apresentar a reação de Jarisch-Herxheimer, quadro clínico febril agudo, geralmente atribuído à libertação de produtos pirogênicos estáveis ao calor pelos treponemas, auto-limitada, que melhora com a terapêutica sintomática [42, 44, 97].

1.8. Objectivos

- Avaliar várias técnicas para o diagnóstico laboratorial de sífilis, incluindo um teste ainda não comercializado, para a pesquisa de anticorpos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. População e Amostras

As amostras analisadas neste estudo foram obtidas em indivíduos de Angola que recorreram aos Hospitais para rastreio de IST, durante o período de Dezembro de 2010 a Março de 2011, aos quais após consentimento informado, foi colhido sangue para obtenção de soro ou plasma. Foram ainda incluídas neste estudo, amostras de soro de doentes que recorreram a diferentes unidades hospitalares da área da grande Lisboa, por suspeita de infecção sífilítica.

O total de indivíduos estudados foi de 607; sendo 263 provenientes de Angola e, 344 dos hospitais de Lisboa. Relativamente à sua distribuição por género, estudaram-se 233 (38,4%) mulheres e 374 (61,6%) homens (Tabela 1).

Tabela 2.1. Caracterização da população estudada.

Origem	Nº casos	(Sexo)	
		Feminino	Masculino
Lisboa	344	146	198
Angola	263	87	176
Total	607	233	374

As amostras provenientes dos hospitais de Angola (263 soros ou plasmas) foram rastreadas para infecção sífilítica pelos testes de RPR e TPHA. Dos hospitais de Lisboa receberam-se 344 amostras de soro de indivíduos com os seguintes diagnósticos: sífilis primária (26), sífilis secundária (44), sífilis latente recente (53), sífilis latente indeterminada (126) e neurosífilis (3). Dos restantes 92 indivíduos; 41 não apresentaram história clínica, sintomas ou sinais compatíveis com diagnóstico de sífilis nem reactividade serológica sendo consideradas como não possuindo infecção a *T. pallidum*, enquanto que, 36 indivíduos por terem efectuado a terapêutica recomendada para sífilis e não apresentarem sintomas ou sinais daquela infecção, foram designados como sífilis tratada, e 15 foram considerados como resultado falso reactivo do teste não treponémico, porque

a reactividade obtida nestes soros por aquele teste não foi confirmada pelos testes treponémicos.

2.1.1. Preparação das Amostras

As amostras (soro ou plasma) provenientes de Angola, foram obtidas por colheita de 5 ml de sangue, para um tubo com ou sem adição de anticoagulante, que depois foi centrifugado a 2500 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos, sendo decantado o sobranço (soro ou plasma) para um tubo de eppendorf de 1,5 ml. Este, após rotulado e envolvido em parafilme foi, de seguida conservado a -20°C. Para a exportação das amostras para Lisboa, obteve-se a anuência do Ministério da Saúde e cumpriram-se todas as normas de biossegurança estipuladas por lei, tendo as amostras sido colocadas em caixa apropriada e gelo seco.

2.2. Métodos

2.2.1. Teste Serológico Não Específico

Teste RPR-Rapid Plasma Reagin

O teste de RPR utilizado neste estudo foi o Macro-Vue-RPR Card Test, que é um teste de floculação que utiliza como antigénio uma suspensão estabilizada de partículas de carbono, contendo cardiolipina, colesterol, lecitina, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e cloreto de colina. O EDTA estabiliza o antigénio, dispensando a necessidade de preparação diária, como é o caso do teste VDRL; o cloreto de colina torna desnecessário a inactivação dos soros, enquanto que as partículas de carvão tornam possível a leitura macroscópica da reacção. O teste foi executado seguindo-se o protocolo estabelecido pela casa comercial quer na avaliação qualitativa quer na quantitativa.

Avaliação Qualitativa

Em todas as amostras incluídas no estudo, foi efectuada avaliação qualitativa pelo teste de RPR. Para tal, colocou-se, com ajuda de uma pipeta, uma gota (50 µl) de amostra não diluída em um dos círculos do cartão fornecido pela casa comercial, espalhando-a por toda a superfície do mesmo. De seguida adicionou-se uma gota de suspensão de antigénio, agitou-se e colocou-se o cartão no agitador rotatório automático a 100 rpm,

durante 8 minutos. Para verificar a correcta execução da técnica e o estado dos reagentes utilizou-se, em simultâneo, controlos positivo e negativo. A leitura foi efectuada sob boa fonte luminosa. O teste foi considerado positivo, quando visualizada floculação (presença de grumos pretos) e, negativo na sua ausência.

Avaliação Quantitativa

Todas as amostras reactivas no teste qualitativo foram tituladas. Para tal efectuou-se diluições seriadas de factor dois até atingir um ponto em que a reacção foi negativa. Colocaram-se 50 µl de soro fisiológico do segundo ao último círculo e 50 µl da amostra no primeiro e segundo círculo do cartão. Homogeneizou-se o conteúdo do segundo círculo e, retirou-se deste 50 µl para o terceiro, e assim sucessivamente tendo-se desprezado no final 50 µl.

Espalhou-se o conteúdo de cada círculo e, adicionou-se uma gota de 20 µl de suspensão de antigénio a cada uma das diluições, mantendo os procedimentos subseqüentes como anteriormente referido. Considerou-se como título a última diluição em que se observou reactividade (Figura 4).

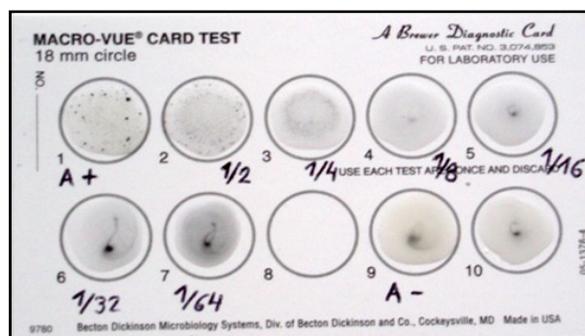


Figura 2.4. Teste RPR. A+: exemplo de uma amostra reactiva e sua titulação; A-: amostra não reactiva. Fonte: DST/IHMT.

2.2.2. Testes Serológicos Específicos

2.2.2.1. Teste de hemaglutinação-TPHA

O teste de hemaglutinação (TPHA) utilizado neste trabalho foi o TPHA 200 de Lab 21 Healthcare Ltd. Este teste utiliza eritrócitos de galinha revestidos com antígenos de *T. pallidum*, estirpe de Nichols que, quando colocados em contacto com o anticorpo espe-

cífico, eventualmente presente na amostra, induz uma reacção positiva (hemaglutinação das células).

Quando a amostra não contém anticorpos específicos, não há reacção e observa-se deposição das células em botão ou em pequeno anel. Para controlo da reacção é utilizada uma suspensão de eritrócitos não sensibilizados que permitem verificar a presença de reactividade inespecífica.

Avaliação Qualitativa

Todas as amostras foram analisadas qualitativamente por este teste, segundo as instruções da casa comercial. Os reagentes foram colocados á temperatura ambiente e bem agitados antes do seu uso. Utilizaram-se sete poços de uma microplaca para o rastreio de cada amostra; no primeiro poço colocaram-se 190 μ l do diluente e 10 μ l da amostra, tendo-se homogeneizado. Colocaram-se 75 μ l da suspensão de células controlo (eritrócitos não sensibilizados) no segundo, quarto e sexto poço; 75 μ l da suspensão de células teste (eritrócitos sensibilizados) no terceiro, quinto e sétimo poço. De seguida, adicionaram-se 25 μ l da amostra diluída no segundo e no terceiro poço. Ao quarto e quinto poço, foram adicionados 25 μ l de controlo negativo e, ao sexto e sétimo poço 25 μ l de controlo positivo.

Homogeneizou-se suavemente e incubou-se à temperatura ambiente em local sem vibração por 60 minutos. A leitura foi efectuada macroscopicamente, tendo-se considerado como reacção positiva a presença de aglutinação no terceiro poço e negativa quando esta não surgia. Os controlos foram validados quando as reacções no quarto, quinto e sexto poço foram negativas e positiva no sétimo (Figura 5).



Figura 2.5. Exemplo de teste TPH reactivo e controlos. Da esquerda para a direita, exemplo de rastreio de uma amostra reactiva e controlo positivo (CP) e controlo negativo (CN).

Avaliação Quantitativa

As amostras reactivas pela avaliação qualitativa, foram tituladas. Para tal foram necessários nove poços por amostra. Depositou-se 190 µl do diluente e 10 µl da amostra no primeiro poço; 25 µl do diluente do quarto ao sétimo poço, 75 µl da suspensão de células controlo no poço dois e 75 µl da suspensão de células teste, do terceiro ao último.

Homogeneizou-se a amostra do primeiro poço e retiraram-se 25 µl para o segundo, terceiro e quarto; do quarto e após homogeneização retiraram-se 25 µl para o quinto, e assim sucessivamente até ao último poço, sendo desprezado os 25 µl finais. Incubou-se e efectuou-se a leitura, sendo considerado como título a última diluição onde se observou reacção.

2.2.2.2. Teste de Imunofluorescência Indirecta.

O teste de Imunofluorescência Indirecta (FTA-Abs) é considerado como o mais sensível de todos os testes treponémicos [35, 66, 116]. Utiliza como antigénio uma suspensão de *T. pallidum* estirpe de Nichols, fixada em lâminas. A amostra a estudar após ser absorvida com treponemas não patogénicos, é colocada em contacto com o antigénio. Se a amostra contiver anticorpos específicos, estes ligam-se ao antigénio; esta ligação vai ser evidenciada pela utilização de anticorpos anti-imunoglobulina de tipo IgG ou IgM humana, marcados com fluoresceína, resultando em espiroquetas visíveis ao microscópio de fluorescência. Neste estudo foi utilizado o teste comercial *Fluorescent Treponema Antibody Absorbed Test-FTA-Abs IgG* da EUROIMMN, tendo-se seguido as instruções do mesmo, na execução da técnica.

Pesquisa de Anticorpos anti-*Treponema pallidum* de tipo IgG.

Com o teste de imunofluorescência indirecta (FTA-Abs) foram estudadas 386 amostras, sendo 42 provenientes dos indivíduos de Angola, nas quais se obtiveram resultados positivos e/ou discrepantes com os testes RPR e TPHA, e 344 provenientes dos doentes dos hospitais de Lisboa. Os reagentes, antes de serem utilizados foram colocados à temperatura ambiente.

Para a absorção das amostras, com objectivo de remover possíveis anti-corpos inespecíficos, colocou-se 50 µl de FTA-Absorvente constituído por *T. phagedanis* e 12,5 µl de soro num eppendorf, o qual, foi homogeneizado no vórtex durante 4 segundos e incubado a 37 °C durante 30 minutos. Este processo não abrange os controlos.

Após a absorção, efectuou-se uma diluição de 1:2 com 25 µl do absorvido e 25 µl de Phosphate Buffered Saline com Tween 20 (PBS Tween 20). Misturou-se muito bem e colocou-se 25 µl da amostra diluída em contacto com o antigénio fixado na lâmina e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Depois da incubação, a lâmina foi lavada com "jacto" de PBS Tween e colocada numa tina com PBS Tween por 5 minutos; pipetaram-se 20 µl do conjugado anti-IgG para a área de reacção, sacudiu-se a lâmina para retirar o excesso de PBS Tween e colocou-se em contacto com o conjugado tendo incubado por 30 minutos ao abrigo da luz directa. Findo este tempo, foi retirada a lâmina, lavada com "jacto" de PBS Tween e posteriormente colocada numa tina com PBS Tween e 10 gotas de azul de Evans durante 5 minutos. Colocou-se uma lamela no suporte de reacção e por cima desta depositaram-se 10 µl de PBS/glicerol por área de reacção.

A lâmina foi sobreposta à lamela, que, em seguida foi observada ao microscópio de fluorescência usando a objectiva de 25X. Em cada determinação foram utilizados controlo positivo e controlo negativo. Na leitura do resultado considerou-se como resultado positivo a observação de fluorescência evidente dos treponemas que cobriam a área de reacção e como negativo a sua ausência (Figura 6).

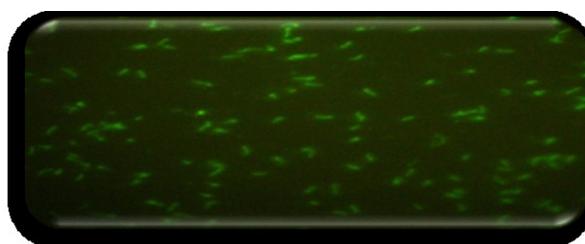


Figura 2.6. Exemplo de um resultado reactivo do FTA-Abs à observação microscópica de fluorescência. Fonte: DST/IHMT

2.2.3. Teste Signal-Spirolipin (CDC)

O teste Signal-Spirolipin é um teste não comercializado proveniente do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta enviado para o laboratório de DST da Unidade de Microbiologia Médica do IHMT para avaliação.

Trata-se de um teste rápido para o diagnóstico de sífilis, que consiste numa combinação dos testes que detectam anticorpos treponémicos e não-treponémicos, desenhado de modo a obter a sua detecção em simultâneo. O teste Signal-Spirolipin é baseado no princípio da imunocromatografia fabricado pela Chembio Diagnostic Systems-Tua, Medfond, New York. Consiste num dispositivo teste de fluxo contínuo composto por uma membrana de nitrocelulose colocada no topo de várias camadas de papel absorvente de celulose, dentro de uma plataforma de plástico, com uma pequena janela para colocação da amostra. Cada membrana apresenta três pontos teste: um para pesquisa de anticorpos não treponémicos (região não treponémica " 2 "), outro para pesquisa de anticorpos treponémicos (região treponémica " T ") e outro para o controlo do procedimento (região " C ").

Para a zona de teste não treponémico "2" foi utilizado o antígeno Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) sintético, preparado de acordo com o procedimento padrão, o qual foi directamente ligado à membrana de nitrocelulose. O antígeno treponémico consiste na proteína recombinante de 17 kDa de *T. pallidum* expressa em *Escherichia coli*, a qual foi ligada a membrana de nitrocelulose na zona teste treponémica " T ". O antígeno da zona controlo consta de anticorpo anti-IgG de cabra, em tampão fosfato salino de pH 7.2 [14].

Para a detecção de eventual reacção antígeno-anticorpo é empregue um conjugado, anti-humano IgG/IgM acoplado com partículas coloidais de ouro que ao ligar-se ao complexo antígeno-anticorpo, resulta na formação de pontos coloridos vermelho a rosa.

Com este novo teste foram analisadas quinhentas e noventa e quatro amostras de soro, tendo-se seguido as instruções do fabricante. Para a sua execução colocaram-se 5-6 gotas da amostra a estudar num tubo com filtro, fornecido com o kit. Na placa depositaram-se 4 gotas da solução de lavagem, deixou-se absorver na membrana após o que se

adicionaram 4 gotas do soro filtrado, seguidas de 4 gotas de solução de lavagem. Posteriormente, foram depositadas 2 gotas do reagente conjugado, seguidas de 4 gotas de solução de lavagem. A primeira leitura foi efectuada aos 2 minutos sendo, o resultado final, obtido após 10 minutos do término do teste, conforme as instruções (Figura 7).



Figura 2.7. Teste Signal-Spirolipin. Da esquerda para a direita; 1- amostra negativa, 2- amostra reactiva pelo teste não treponémico, 3- amostra reactiva pelo teste treponémico e 4 - amostra reactiva para ambos os testes (não treponémico e treponémico) Fonte: DST/IHMT.

Um resultado positivo (indicativo de sífilis) é caracterizado pelo aparecimento de reacção (ponto colorido vermelho a rosa) nas três zonas do teste (treponémico, não treponémico e controlo), enquanto que um resultado negativo é caracterizado por ausência de qualquer reacção, excepto para a zona de controlo.

A presença de reacção apenas na zona treponémica e controlo, foi considerada como apenas teste treponémico positivo podendo ser interpretado como possível sífilis primária precoce, sífilis latente tardia ou mesmo sífilis tratada já que os anticorpos treponémicos se mantêm mesmo após tratamento correcto.

Por outro lado, quando a reacção foi apenas visível na zona do teste não treponémico e no controlo, foi interpretado como um resultado de falso positivo para o teste não treponémico. A não observação de qualquer reacção invalidou o teste.

2.2.4. Pesquisa de DNA de *Treponema pallidum*

A pesquisa de DNA de *T. pallidum*, foi efectuada por técnica de amplificação de ácidos nucleicos, designada por técnica de PCR multiplex (PCR-M) na qual se utilizaram dois pares de *primers*, para genes alvos diferentes, na mesma mistura de reacção. Com esta técnica foram estudadas todas as amostras de soro provenientes dos hospitais de Lisboa e as com resultados positivos e/ou discrepantes pelos testes serológicos provenientes de Angola, tendo-se previamente efectuado extracção do DNA.

2.2.4.1. Extracção de DNA Total

Para a extracção e isolamento do DNA utilizou-se o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit da Quiagen, tendo-se procedido de acordo com as instruções do fabricante. Pipetaram-se 20 µl de proteinase K para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, ao qual foi adicionado 200 µl da amostra e 200 µl do tampão de lise (AL). Homogeneizou-se no vórtex por 15 segundos, e incubou-se a 56 °C durante 30 minutos. Centrifugou-se por um minuto para remoção das gotas do interior da tampa e adicionaram-se 3 µl de DNA de timo de vitela (calthymus 10,5 mg/µl) diluído a 1:10, e em seguida 200 µl de etanol, tendo-se misturado no vórtex durante 3-5 segundos.

Após pequena centrifugação, a mistura foi colocada numa coluna Spin QIAamp inserida num tubo colector de 2 ml e centrifugada a 8. 000 rpm por um minuto. Colocou-se a coluna em tubo de recolha limpo e adicionaram-se 500 µl de tampão de lavagem AW1, centrifugando-se a 8. 000 rpm, durante 1 minuto.

De seguida e após colocação da coluna em novo tubo de recolha limpo, lavou-se novamente com 500 µl de tampão de lavagem AW2 e, centrifugou-se a 14. 000 rpm durante 3 minutos. A coluna foi colocada num novo tubo limpo e centrifugada a 14. 000 rpm durante 1 minuto para a remoção total do tampão de lavagem.

Com a ajuda de uma micropipeta, removeram-se eventuais excessos de tampão do anel da coluna, com bastante cuidado para não tocar no filtro. De seguida efectuou-se a eluição do DNA retido na coluna, utilizando-se 80 µl do tampão de eluição (AE) e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de centrifugação a 14.- 000 rpm durante 1 minuto.

Retirou-se o filtrado contendo DNA para um tubo de 1.5 ml com tampa e armazenou-se a - 4 °C. O mesmo método foi utilizado para a extracção de DNA a partir de 200 µl de extracto testicular (5×10^3 treponemas/µl) de coelho infectado com *T. pallidum*, o qual foi utilizado como controlo positivo para a técnica de PCR-Multiplex.

2.2.4.2. Amplificação de DNA de *Treponema pallidum*-PCR Diagnóstica

Para pesquisa de DNA de *T. pallidum* utilizou-se uma técnica de amplificação de DNA que tem como alvos de amplificação fragmentos do gene da lipoproteína da membrana de 47 kDa e do gene da enzima DNA polimerase (*polA*) descritas por Orle *et al.* (1996) e Liu *et al.* (2001), respectivamente. Esta técnica de PCR foi designada por PCR-Multiplex devido à associação na mesma mistura de reacção dos dois pares de *primers*: o par KO3A/KO4 que amplifica um fragmento de 260 pb do gene 47 kDa e o par *polA*-F/*polA*-R que amplifica um fragmento de 378 pb do gene *polA*. A descrição dos *primers* encontra-se efectuada na tabela 2.

Tabela 2.2. Gene alvo, descrição de sequência de *primers* e tamanho dos produtos amplificados pela técnica PCR-M. Adaptado de: Orler *et al* e Lui *et al* [80, 94].

Gene Alvo	<i>Primers</i>	Sequencia (5'→3')	Dimensão do produto amplificado (bp)
<i>Tp47</i>	KO3A-F	AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT	260
	KO4-R	AGAGCCATCAGCCCTTTTCA	
<i>polA</i>	<i>polA</i> -F	AAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT	378
	<i>polA</i> -R	CACAGTGCTCAAAAACGCGTGCACG	

Mistura de Reacção para a técnica de PCR Multiplex

Para cada reacção de amplificação, preparou-se num volume total de 20 µl uma solução em água ultra-pura de *primers* *PolA*-R/*PolA*-F e KO3A/KO4, na concentração de 0,5 µM, de tampão imunobuffer 1x (tampão fornecido com a enzima utilizada), 0,4 µM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 2,5 µM de cloreto de magnésio (MgCl₂), e 0,5 U da enzima DNA polimerase-Immolase (Bioline). A mistura de reacção foi distribuída por tubos PCR estéreis de 0,2 ml. Numa área fisicamente distinta da utilizada na preparação da mistura de reacção, a cada tubo foi adicionado 5 µl de DNA correspondente a cada amostra, tendo-se também utilizado, em simultâneo com o estudo das amostras, um controlo positivo de DNA de *T. pallidum* e negativo de água. Após adição das amostras e dos controlos, os tubos foram colocados no termociclador para amplificação. As reacções de amplificação foram efectuadas no termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf Harburgo, Alemanha) com as seguintes condições: primeiro ciclo (activação

da enzima) a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificação: desnatura-ção a 94°C, ligação de *primers* às sequências alvo a 57°C e extensão a 72°C, por 30 segundos cada, e a etapa final de extensão a 72°C durante 15 minutos.

Visualização do DNA

Para a visualização dos produtos amplificados, preparou-se um gel de agarose (Biorad 162-0100) a 1,5%, adicionado de brometo de etídio (Sigma) a 0,5 µg/ml. Cada amostra (10 µl do produto amplificado), foi misturada com 3 µl de solução saturada de sacarose de azul de bromofenol e colocada no poço do gel.

Em todos os géis utilizou-se o marcador HyperLadder IV de 100 bp (Biolíne), para confirmar a massa molecular dos produtos amplificados. O gel foi depois sujeito a um campo eléctrico de 100V durante 1 h, no aparelho " Electrophoresis Power Supply " (EPSL 301 da Amerstram Farmacia Biotech). De seguida, o gel foi observado por exposição à luz ultra-violeta no transluminador Gel Doc XR (Bio-RAD), equipamento que permite captar imagem digital do gel exposto, através do programa Vue-1D Analysis Software (versão 4.6.1) da Bio-Rad.

A presença de infecção por *T. pallidum* (resultado positivo) verificou-se pela visualização de uma banda de DNA de 260 pb e/ou de 378 pb, correspondendo o primeiro ao fragmento do gene da lipoproteína de 47 kDa e o segundo, ao fragmento do gene de DNA polimerase I (Figura 8).

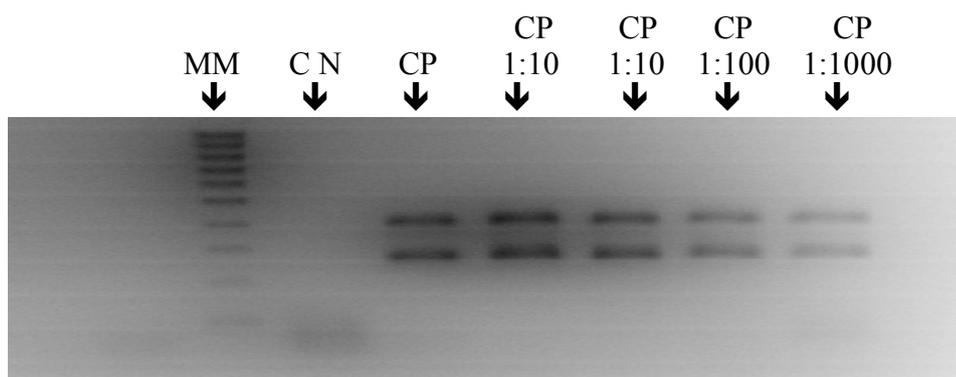


Figura 2.8. Visualização em gel de agarose dos produtos (controlos) amplificados.
Legenda: MM- Marcador de Massa Molecular (200 bp); CN- Controlo Negativo; CP - Controlo Positivo sem diluição e diluições seriadas de CP (DNA *Treponema pallidum*) de 1:10 a 1:1000.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Pesquisa de Anticorpos Anti-*T. pallidum*

3.1.1. Análise Geral

Todas as 607 amostras de soro incluídas no estudo foram analisadas pelos testes serológicos para o diagnóstico de sífilis, um teste não específico (RPR) para rastreio e um teste específico (TPHA) para confirmação. As amostras dos doentes com suspeita de sífilis e as amostras com resultado reactivo ou discrepante, dos indivíduos rastreados para infecção por *T. pallidum*, foram também analisadas pela técnica de imunofluorescência indirecta (FTA-Abs). Os resultados obtidos encontram-se sumariados na tabela 3.

Tabela 3.3. Resultados obtidos com os testes RPR e TPHA

RPR		TPHA	
Não Reactivo	Reactivo	Não Reactivo	Reactivo
335/607	272/607	304/607	303/607
(55,2%)	(44,8%)	(50,1%)	(49,9%)

Na globalidade dos soros estudados, foram reactivos 44,8%, 49,9% e negativos 55,2%, 50,1% das amostras respectivamente pelos testes RPR e TPHA.

Analisando os resultados obtidos entre os testes RPR e TPHA foi possível verificar que 280/607 (46,1%) das amostras foram negativas, e que 248/607 (40,8%) das amostras foram reactivas em ambos os testes (tabela 4).

Tabela 3.4. Resultados obtidos com os testes de RPR e TPHA.

		TPHA		Total
		Reactivo	Não Reactivo	
RPR	Reactivo	248	24	272
	Não Reactivo	55	280	335
	Total	303	304	607

Em 79 amostras os resultados foram discrepantes, sendo que 55 foram reactivas quando estudadas pelo teste TPHA e não reactivas pela técnica de RPR. Nestes casos pode colocar-se a hipótese de se tratar de amostras de indivíduos em estágio inicial ou tardio de infecção ou indivíduos que foram diagnosticados e tratados para sífilis no passado, sendo importante saber qual a história clínica dos mesmos, para uma melhor interpretação destes resultados.

Ao averiguar-se a proveniência destes soros verificou-se que 15/55 pertenciam aos indivíduos de Angola sendo que o teste FTA-Abs confirmou o resultado do TPHA em nove casos e em seis apenas o teste TPHA foi reactivo. Por outro lado os 40/55 (confirmados por FTA-Abs excepto 3) provenientes dos hospitais de Lisboa apresentavam a seguinte distribuição: sífilis primária (3), sífilis tratada (34) e grupo sem sífilis (3). Nestes últimos apenas o TPHA foi reactivo, provavelmente tratando-se de casos de falso positivo pelo teste de hemaglutinação.

Nas restantes amostras com resultado discrepante (24), o teste RPR foi reactivo enquanto que o TPHA foi negativo. A hipótese a colocar é a de se tratar de resultados de falsa reactividade do teste não treponémico. Esta hipótese pode colocar-se relativamente a 19 amostras (4 do grupo de Angola e 15 de Lisboa) nas quais o teste de FTA-Abs, confirmou a negatividade do teste TPHA, enquanto que nas outras 5 amostras (1 de Angola e 4 de Lisboa), a reactividade do teste RPR foi confirmada pelo teste FTA-Abs, tratando-se provavelmente de resultados falso negativos, pelo teste de TPHA.

3.1.2. Comparação dos Testes Serológicos

Na análise de sensibilidade e especificidade de um teste usa-se geralmente um teste considerado como “ gold standard ” que serve de referência e com o qual os outros testes irão ser comparados. *T. pallidum* é um microrganismo fastidioso, não cultivável in vitro, não existindo um teste serológico ideal que possa ser utilizado para o diagnóstico definitivo de sífilis em todas as fases da infecção. A técnica de FTA- Abs é geralmente a utilizada como teste padrão por reunir, de um modo geral, as melhores condições de sensibilidade e especificidade [17, 18, 35, 68, 116, 118]. Estudos anteriores demonstraram que este teste, apresentou uma sensibilidade de 70-100% em infecção recente [6, 12, 23, 116], de 100% em casos de sífilis secundária e, de 96-100% quando em situações de

sífilis latente. Por outro lado a sua especificidade situa-se entre 92-99%. Neste estudo utilizou-se o teste FTA- Abs para avaliação dos testes serológicos utilizados no diagnóstico laboratorial de sífilis tendo-se efectuado a comparação dos resultados obtidos, pelo estudo de 386 soros, nos quais todos os testes foram executados.

Comparados os resultados obtidos entre o teste RPR e o teste treponémico FTA-Abs (tabela 5), verificou-se que, 65,3% (252/386) das amostras reactivaram, enquanto que 17,6% (68/386) foram negativas em ambos os testes. Relativamente às amostras com resultados discrepantes (66), observou-se que 20/46 foram reactivas apenas com o teste RPR, o que, resulta numa taxa de falsa reactividade de 5,2% (20/386).

Tabela 3.5. Comparação dos resultados obtidos com os testes RPR e FTA-Abs. Sensibilidade (252/298) – 84,5%; Especificidade (68/88) – 77,3%; Taxa de concordância (320/386) – 82,9%.

		FTA-Abs		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
RPR	Reactivo	252	20	272
	Não Reactivo	46	68	114
	Total	298	88	386

Quanto às 46 amostras que foram reactivas no teste FTA-Abs, e não reactivas no teste RPR, como anteriormente mencionado, podem ter tido origem em indivíduos em estágio inicial ou tardio de infecção ou que no passado foram diagnosticados e tratados para infecção sífilítica. Em 45 destas amostras o TPHA foi também reactivo, sendo de salientar que esses doentes pertenciam ao grupo de doentes com sífilis tratada com excepção de três com diagnóstico de sífilis primária.

A avaliação da sensibilidade e especificidade do teste RPR quando comparado com o teste FTA-Abs foi de 84,5% e 77,3% respectivamente, com uma taxa de concordância de 82,9%. O valor da sensibilidade do teste RPR obtido neste estudo está de acordo com os encontrados na literatura, que referem uma sensibilidade deste teste em cerca de 86% na sífilis primária, de 100% na sífilis secundária, de 98% na sífilis latente e de 73% na

sífilis tratada [4, 16, 74, 100]. Os testes não treponémicos são mais sensíveis nas fases secundária e latente recente, enquanto que no início da infecção, podem ainda não ser reactivos e, na fase tardia, podem ter deixado de o ser [3, 18].

Relativamente à especificidade encontrada neste estudo, ela foi menor que a descrita por outros autores que obtiveram valores entre 96% - 98% [52, 76].

Esta diferença poderá estar relacionada com a população estudada, constituída por indivíduos em que patologias relacionadas com resultado de falsa positividade do teste não treponémico (como infecção por HIV, toxicoddependência, malária, doenças autoimunes) podem estar presentes. Uma melhor avaliação resultaria do acesso à história clínica, que permitisse verificar todos os dados clínicos desses casos.

Da comparação entre os testes treponémicos TPHA e FTA-Abs (tabela 6), observou-se que, ambos os testes reactivaram em 294/386 (76,2 %) das amostras, não tendo reactivado em 77/386 (19,9%). Em 15 amostras os resultados não concordaram sendo que, 9 casos (reactivos no teste TPHA e não reactivos no teste FTA-Abs) poderão estar relacionados com resultados de falsa reactividade com o teste TPHA, visto que apenas este teste foi reactivo. A falsa positividade em indivíduos aparentemente saudáveis tem sido referida como cerca de 1% e, embora as suas causas sejam desconhecidas em alguns casos tem sido relacionada com a toxicoddependência, doenças do colagénio, lepra [16]. Neste estudo a taxa de falsa reactividade do teste TPHA encontrada foi de 2,3% (9/386), superior à referenciada por outros autores, mas como o maior número de casos foi observado nos soros provenientes dos indivíduos de Angola, poderá estar relacionado com outras situações que, um melhor conhecimento de história clínica desses doentes poderia ajudar a esclarecer.

As 6/15 amostras com resultado discrepantes, (TPHA negativo e FTA-Abs reactivo) podem relacionar-se com amostras de indivíduos com sífilis latente, tardia, ou tratados para sífilis, visto que o teste FTA-Abs apresenta uma maior sensibilidade em relação ao teste TPHA, na detecção daqueles casos, sendo também o teste em que menos diminuiu a reactividade, após a terapêutica. Esse parece ser o caso em amostras dos doentes de Lisboa os quais apresentam diagnóstico de sífilis latente (2), sífilis primária (1) e neu-

rossifilis (1), sendo de reforçar a importância de se efectuar um teste confirmatório quando em presença de situações clínicas sugestivas de sífilis.

Tabela 3.6. Comparação dos resultados obtidos com os testes TPHA e FTA-Abs. Sensibilidade (294/298) – 98,7%; Especificidade (77/88) – 87,5%; Taxa de concordância (371/386) – 96,1%.

		FTA-Abs		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
TPHA	Reactivo	294	9	303
	Não Reactivo	6	77	83
	Total	300	86	386

Quando comparado o teste TPHA com o teste FTA-Abs, para o cálculo da sensibilidade e especificidade daquele teste, observou-se um valor de 98,7% para o primeiro parâmetro e de 87,5% para o segundo, tendo os dois testes concordado em 96,1% dos casos. O valor da sensibilidade da técnica TPHA definido neste estudo, está de acordo com valores obtidos por outros autores que referem que a mesma se situa entre 60-90% para os casos de sífilis primária, 100% na sífilis secundária, 97 a 100% na sífilis latente e de 98% na sífilis tardia [4, 16, 76]. Relativamente à especificidade, o valor obtido foi menor que os valores encontrados em alguns trabalhos, o que poderá ser devido ao número de falsos positivos encontrados neste estudo, sendo necessário verificar a história clínica desses casos para um melhor esclarecimento.

3.1.3. Avaliação do teste rápido Signal-Spirolipin (CDC)

O diagnóstico serológico de sífilis baseia-se na pesquisa de anticorpos não treponémicos, pelos testes RPR ou VDRL e de anticorpos treponémicos pelos testes TPHA, FTA-Abs, técnicas imunoenzimáticas ou de Westernblot. Os testes treponémicos têm sido sobretudo utilizados para confirmar a reactividade de um teste não treponémico e nas situações de suspeita clínica de sífilis em doentes com teste não treponémico negativo [108, 122].

Contudo, os testes treponémicos, não são úteis para monitorizar o resultado da terapêutica ou indicar presença de reinfeção ou recidiva, porque geralmente se mantêm reactivos pelo resto da vida do doente.

Para a execução de qualquer um dos testes (não treponémicos e treponémico) é necessária a utilização de algum equipamento laboratorial especializado. Por outro lado, qualquer um deles tem de ser efectuado em laboratório e por técnicos treinados, e na maior parte dos casos os resultados apenas estão disponíveis horas ou dias após a colheita da amostra.

Um teste serológico para o diagnóstico de sífilis que possa ser realizado na própria consulta, enquanto o doente aguarda o resultado é importante e vantajoso, não só porque permite aconselhamento e tratamento imediato, como também a notificação dos parceiros, se necessário.

Efetivamente, um teste desse tipo será útil em zonas em que não exista laboratório de patologia clínica ou em que o acesso ao mesmo seja complicado. Com base nestas necessidades efectuou-se a avaliação do teste rápido *Signal-Spirolipin* (CDC), que permite a pesquisa em simultâneo de anticorpos não treponémicos e treponémicos, com obtenção dos resultados em cerca de 10 minutos. Com o teste *Signal-Spirolipin* (CDC), estudaram-se 594 amostras de soro, tendo os resultados sido comparados com os obtidos com os testes RPR e TPHA. A sua avaliação foi também efectuada pela comparação com o teste FTA-Abs em 373 amostras de soro.

Os resultados obtidos com o teste *Signal-Spirolipin* estão discriminados na tabela 7, tendo sido reactivos 294/594 (49,5%) e 286/594 (48,1%) e não reactivos 300/594 (50,5%) e 308/594 (51,9%) respectivamente pelos testes não treponémico (CDC-2) e treponémico (CDC-T).

Tabela 3.7. Resultados obtidos com o teste *Signal-Spirolipin*.

CDC-2		CDC-T	
Não Reactivo	Reactivo	Não Reactivo	Reactivo
300/594	294/594	308/594	286/594

3.1.3.1. Teste Signal-Spirolipin (teste não treponémico CDC-2)

Comparação com o teste RPR

Na comparação do teste CDC-2 com o teste RPR (tabela 8), verificou-se que 44,1% (262/594) das amostras, foram reactivas e 49,5% (291/594) não reactivas por ambos os testes. A discrepância de resultados entre os dois testes foi observada em 41 amostras, sendo 32 reactivas apenas com o teste CDC-2 e 9 apenas com o teste RPR. Das 32 amostras apenas reactivas com o teste CDC-2, em 12 esse resultado foi confirmado pelo teste TPFA, podendo os restantes casos (22) estarem relacionados com resultados falso positivo do teste CDC-2, resultando numa taxa de falsa reactividade de 3,7% (22/594).

Tabela 3.8. Comparação dos resultados obtidos com os testes CDC-2 e RPR.

		RPR		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
CDC-2	Reactivo	262	32	294
	Não Reactivo	9	291	300
	Total	271	323	594

Também se observou que, das 9 amostras negativas com o teste CDC-2 e reactivas com o teste RPR, em 6 o teste TPFA confirmou o resultado do teste CDC-2 enquanto que em 3 tal não sucedeu, tratando-se provavelmente de resultados falso negativo do teste CDC-2.

A utilização do teste RPR como termo de comparação resulta numa sensibilidade de 96,7% (262/271) e uma especificidade de 90,1% (291/323). Com base nos dados apresentados, verificou-se que o teste CDC-2 apresenta maior reactividade que o RPR. A taxa de concordância entre os dois testes foi de 93,1% (553/594). A sensibilidade obtida neste estudo foi semelhante à obtida por Castro *et al.* (2010), que obtiveram uma sensibilidade de 96,5% contudo, a especificidade e a taxa de concordância obtida por aqueles autores foi de 97,7% e 97,9% [14], valores superiores aos deste trabalho, o que provavelmente estará relacionado com a falsa positividade observada no presente estudo.

O teste não treponémico CDC-2 foi também avaliado pela comparação com o teste treponémico TPHA (tabela 9), tendo-se verificado que 256/594 (43,1%) amostras reactivaram, enquanto que 257/594 (43,3%) amostras não reactivaram em ambos os testes, havendo desacordo de resultados em 81 amostras, das quais 38 reactivas apenas pelo teste CDC-2 e 43 apenas com o teste TPHA.

Tabela 3.9. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-2 e TPHA.

		TPHA		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
CDC-2	Reactivo	256	38	294
	Não Reactivo	43	257	300
	Total	299	295	594

A sensibilidade e especificidade do teste CDC-2 em relação ao teste TPHA foi de 85,6% (256/299) e 87,1% (257/295) com taxa de concordância de 86,4% (513/594) valores comparáveis aos obtidos pelo teste RPR nesta mesma população (sensibilidade 82,6 %, especificidade 91,8% e taxa de concordância 87,2%) podendo as diferenças existentes estar relacionadas com os casos de falsa reactividade de um e outro teste.

Comparação com o teste FTA-Abs

Na comparação do teste CDC-2, com o teste treponémico FTA-Abs, averiguou-se que em ambos os testes 69,7% (260/373) das amostras foram reactivas e 13,9% (52/373) foram negativas.

Tabela 3.10. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-2 e FTA-Abs.

		FTA-Abs		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
CDC-2	Reactivo	260	28	288
	Não Reactivo	33	52	85
	Total	293	80	373

Contudo, foi observada uma discrepância de resultados em 61 amostras, resultando quer dos casos de falsa reactividade, quer dos casos de falsa negatividade já referidos e, relacionados com amostras provenientes de indivíduos tratados para sífilis nos quais os testes não treponémicos acabaram por negativar.

A sensibilidade e especificidade do teste CDC-2 quando comparada com o teste de FTA-Abs, foi de 88,7% (260/293) e 65 % (52/80) respectivamente. A taxa de concordância de ambos os testes foi de 83,6% (312/373). O teste CDC-2 avaliado, apresentou uma sensibilidade e especificidade comparáveis às obtidas com o teste RPR utilizado neste estudo.

3.1.3.2. Teste Signal-Spirolipin (teste treponémico CDC-T)

Comparação com o teste TPHA

Tabela 3.11. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-T e TPHA.

		TPHA		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
CDC-T	Reactivo	277	9	286
	Não Reactivo	22	286	308
	Total	299	295	594

Na comparação do teste treponémico (CDC-T) do teste *Signal-Spirolipin* com o teste TPHA verificou-se que 277/594 (46,6%) das amostras foram reactivas e que 286/594 (48,2%) não reactivaram para ambos os testes. Verificou-se disparidade de resultados em 31 amostras, das quais 9 reactivas com o teste CDC-T e não reactivas com o teste TPHA, e 22 reactivas com o teste TPHA e não reactivas com o teste CDC-T.

Na averiguação dos resultados obtidos com os outros testes verificou-se que relativamente a estas últimas amostras (22), em todas o teste RPR foi negativo, (excepto em 3 casos reactivos com títulos inferiores à 1:2) e, em 10 o teste FTA-Abs confirmou o resultado negativo do teste CDC-T. No que se refere às 9 amostras com teste CDC-T reactivo e TPHA negativo averiguou-se que a reactividade daquele teste foi confirmada pelos outros testes em 8 casos.

Comparando o teste rápido CDC-T com o teste TPHA, obteve-se uma sensibilidade de 92,6% (277/299), uma especificidade de 97,0% (286/295) e taxa de concordância de 94,8% (563/594) valores dentro de parâmetros aceitáveis. O teste de TPHA serviu como teste padrão por reunir boas condições de sensibilidade e especificidade tal como referem muitos autores [33, 83, 91, 119], os quais, obtiveram uma sensibilidade que variou entre 95,6-98,4% e uma especificidade entre 95,7- 97,3% [33, 85, 91, 112].

Por outro lado, o teste TPHA é o que geralmente se utiliza na rotina laboratorial para o diagnóstico serológico de sífilis. Os valores encontrados neste estudo são próximos dos que Castro *et al.* (2010) obtiveram no seu estudo, (sensibilidade de 97% e especificidade de 95,5%) na comparação com o teste TP.PA (*T.pallidum* Particle Agglutination) [14].

Comparação com o teste FTA-Abs

Nas 373 amostras de soro em que se efectuou os testes CDC-T e FTA-Abs, obteve-se resultados positivas em 278 (74,5%) e negativos em 73 (19,6%) das amostras, para ambos os testes (tabela 12). A discrepância de resultados foi encontrada em 22 amostras, 7 reactivas apenas com o teste CDC-T e 15 com o teste FTA-Abs.

Comparativamente às 15 amostras, apenas reactivas com o teste FTA-Abs; verificou-se que três eram provenientes de doentes com sífilis latente e uma de um doente com sífilis

primária que parecem não terem sido identificados pelo teste em estudo, pertencendo os restantes ao grupo dos doentes com sífilis tratada. Por outro lado em relação com as 7 amostras reactivas apenas com o teste CDC-T verificou-se que em 6 os testes RPR e CDC-2 foram também reactivos, enquanto que na restante, o teste TPHA foi negativo, ficando a dúvida de como interpretar estes resultados. Contudo, apenas uma história clínica mais aprofundada e isolamento ou não de *T. pallidum* poderiam ilustrar o significado real dos mesmos.

Tabela 3.12. Comparação dos resultados obtidos com os testes de CDC-T e FTA-Abs.

		FTA-Abs		
		Reactivo	Não Reactivo	Total
CDC-T	Reactivo	278	7	285
	Não Reactivo	15	73	83
	Total	293	80	373

A sensibilidade do teste CDC-T, quando comparado com teste FTA-Abs foi de 94,9%, com especificidade de 91,3 % e taxa de concordância de 94,1%.

Um teste de rastreio ideal será aquele que apresenta a capacidade de permitir diagnóstico etiológico o mais precocemente possível, devendo ainda detectar todos os casos de doença e ser negativo na sua ausência. Tendo estes princípios em conta, determinou-se a sensibilidade dos testes Signal-Spirolipin, RPR e TPHA em cada um dos grupos de doentes em diferentes fases de infecção, num grupo de doentes diagnosticados com sífilis no passado e correctamente tratados. A especificidade de cada um dos testes foi determinada pelo estudo de soros do grupo considerado como não tendo infecção por *T. pallidum* (tabela 13).

Tabela 3.13. Sensibilidade e especificidade dos testes RPR, CDC-2,TPHA e CDC-T em comparação com o teste FTA-Abs.

Legenda: Sens.- Sensibilidade; Esp.- Especificidade; N° +vo- Número Positivo; N°-vo- Número Negativo. **SP**-Sífilis Primária; **SS**-Sífilis Secundária; **SLR**- Sífilis Latente Recente; **SLTI**-Sífilis Latente Tardia indeterminada; **NS**-Neurossífilis; **ST**-Sífilis Tratada; **S/SI**-Sem Sífilis.

	RPR		CDC-2		TPHA		CDC-T	
	Sensibilida- de.N°+vo/FT A-Abs +vo (%)	Especifici- dade. N° - vo/ FTA- Abs -vo (%)	Sensibilida- de.N° +vo/ FTA-bs +vo (%)	Especifici- dade. N° - vo/ FTA- Abs-vo (%)	Sensibilida- de.N° +vo/ FTA-Abs +vo (%)	Especifide N° - vo/ FTA- Abs- vo (%)	Sensibilida- de.N° +vo/ FTA-Abs +vo (%)	Especifici- dade. N° - vo/ FTA- Abs-vo (%)
SP	23/26 (88,5%)	–	26/26 (100%)	–	25/26 (96,2%)	–	25/26 (96,2%)	–
SS	44/44 (100%)	–	44/44 (100%)	–	44/44 (100%)	–	44/44 (100%)	–
SL R	53/53 (100%)	–	53/53 (100%)	–	53/53 (100%)	–	53/53 (100%)	–
SL I	126/126 (100%)	–	124/126 (98,4%)	–	124/126 (98,4%)	–	123/126 (97,6%)	–
NS	3/3 (100%)	–	3/3 (100%)	–	2/3 (66,7%)	–	3/3 (100%)	–
ST	2/36 (5,6%)	–	10/36 (27,8%)	–	36/36 (100%)	–	28/36 (77,8%)	–
S/S I	–	41/56 (73,2%)	–	44/56 (75%)	–	56/56 (100%)	–	50/56 (89,3%)

No grupo de doentes com sífilis primária (26), a sensibilidade do teste RPR foi de 88,5%, do teste CDC-2 100% e dos testes TPHA e CDC-T de 96,2%. Nos grupos de doentes de sífilis secundária, sífilis latente recente e neurossífilis a sensibilidade foi de 100% para qualquer um dos testes, excepto para o teste TPHA na NS (66,7%), enquanto que nos doentes com sífilis latente indeterminada foi de 100% para o teste RPR, de 98,4% para os testes CDC-2, TPHA e de 97,6% para o teste CDC-T.

Quando estudados os soros (36) dos indivíduos tratados para sífilis verificou-se que mantiveram reactividade pelos testes não treponémicos RPR e CDC-2, 2/36 (5,6%) e 10/36 (27,8%) respectivamente, enquanto que 36/36 (100%) e 28/36 (77,8%) continuaram reactivos quando estudados pelos testes TPHA e CDC-T.

A avaliação da sensibilidade dos testes serológicos no grupo de doentes com sífilis activa (252), baseada numa abordagem convencional (teste RPR reactivo confirmado por teste TPHA) ou pelo teste rápido (CDC-2 positivo confirmado por CDC-T), foi de 97,2% (245/252) e 98,4% (248/252) respectivamente. Numa abordagem semelhante Castro *et al.* (2010), obtiveram uma sensibilidade de 96,5% [14].

Quando os soros dos indivíduos sem evidência clínica de sífilis, e teste FTA-Abs negativo foram avaliados, 15 e 12 amostras que apresentaram reactividade pelos testes RPR e CDC-2. Os mesmos soros quando estudados pelo teste TPHA foram negativos, enquanto que 6 resultaram reactivos com o teste CDC-T. Assim a especificidade dos testes não treponémicos foi de 73,2% e de 75% para os testes RPR e CDC-2 enquanto que para os testes treponémicos TPHA e CDC-T foi de 100% e 89,3%, respectivamente.

Dos dados obtidos foi possível verificar que nos diferentes estádios da infecção o teste Signal-Spirolipin (CDC) apresentou um comportamento idêntico aos testes clássicos utilizados no diagnóstico laboratorial nas situações de sífilis secundária, latente recente e neurosífilis, tendo falhado no diagnóstico de 2 casos de sífilis latente. Resultados análogos foram obtidos por Castro *et al.* (2010), que no estudo de doentes com sífilis, o teste rápido também falhou no diagnóstico de dois casos de sífilis latente [14].

3.1.4. Amplificação de DNA de *Treponema pallidum*-PCR Diagnostico

A pesquisa de DNA de *T. pallidum* por técnica de PCR Multiplex (PCR-M), foi efectuada nas amostras de soro provenientes dos indivíduos de Angola com resultados serológicos positivos ou discrepantes (19) e nas amostras de soro (344) provenientes dos indivíduos dos hospitais de Lisboa.

Em relação às amostras provenientes dos indivíduos de Angola, em nenhuma foi detectado DNA daquele microrganismo. Para a discriminação dos resultados obtidos pela técnica de PCR-M nas amostras de soro, provenientes dos doentes dos hospitais de Lisboa, dividiram-se aqueles em grupo I e II, de acordo com o diagnóstico clínico e laboratorial anteriormente referido.

No grupo I incluíram-se os doentes com sífilis activa: sífilis primária, secundária, latente recente ou indeterminada e neurosífilis e no grupo II associaram-se indivíduos con-

siderados como não tendo infecção por *T. pallidum*, doentes tratados para sífilis e doentes em que o resultado do RPR foi considerado como falso positivo. Na globalidade das amostras dos doentes considerados como tendo sífilis (252), obteve-se a amplificação de DNA de *T. pallidum* em 33% (83/252) dos casos. Esta, quando discriminada pelos vários estádios de infecção foi de 42,3%, 56,8% e 66,7% na sífilis primária, secundária e neurosífilis enquanto que na SLR (sífilis latente recente) e SLT (sífilis latente tardia) foi de 30,2% e 23% respectivamente (tabela 14).

Nenhuma das amostras dos indivíduos do grupo II foi amplificada pela técnica de PCR-M.

Tabela 3.14. Resultados obtidos pela técnica de PCR-M nas amostras de soro, dos indivíduos com sífilis activa.

	Positivo	Negativo	Total de doentes
SP	11 (42,3%)	15 (57,7%)	26 (100%)
SS	25 (56,8%)	19 (43,2%)	44 (100%)
NS	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100%)
SLR	16 (30,2%)	37 (69,8%)	53 (100%)
SLT	29 (23%)	97 (77%)	126 (100%)
Total	169 (67%)	83 (33%)	252 (100%)

A técnica de PCR-M utilizada neste estudo teve como base as descritas por Lui *et al.* (2001) e Orle *et al.* (1996) [80, 94], tendo-se associado numa mesma mistura de reacção os dois pares de *primers* descritos por aqueles autores. Essa associação teve como objectivo tentar tornar a técnica mais sensível e específica, de execução mais rápida e com menores custos.

Quanto aos resultados obtidos neste estudo por esta técnica, o número de amostras positivas (grupo I) foi relativamente baixo, tendo em conta que eram provenientes de indivíduos com sífilis.

Este resultado, provavelmente, relacionou-se com o tipo de amostra (soro) utilizada para a pesquisa. Orle *et al.*, obtiveram uma sensibilidade de detecção de 91% e Lui *et al.* de

95,8%, mas as amostras por eles estudadas foram de exsudados de úlceras genitais, lesões ricas em *T. pallidum* [80, 94].

Por outro lado, Martin *et al.* (2001), obteve uma amplificação de produto específico em 40% das amostras de sangue total de indivíduos com sífilis [86]. Diversos autores defendem que o exsudado de úlceras ou de lesões secundárias e de exsudado de biópsia do lóbulo de orelha, parecem ser o tipo de amostra com as quais se pode obter melhores resultados para a pesquisa de DNA de *T. pallidum*, quando comparadas com amostras de sangue total [15, 16, 19, 94, 96, 113].

No que se refere à percentagem de positividade nos diferentes estádios de infecção, esta foi superior na fase secundária, sendo menor na fase latente indeterminada, devendo esses valores estar relacionados com a espiroquetemia, já que esta é de maior intensidade na sífilis secundária (SS), seguida da primária e diminuindo nas fases de latência [70, 100].

Os resultados obtidos no grupo de doentes sem sífilis activa (grupo II) parecem indicar que esta técnica tem boa especificidade, já que foi negativa nos indivíduos sem infecção ou que a tendo adquirida, tinham efectuado terapêutica específica. Contudo, os números são baixos para se tirar uma conclusão mais definitiva.

4. CONCLUSÕES

A sífilis é uma doença complexa cujo diagnóstico clínico e laboratorial apresenta dificuldades e limitações. Por esta razão, um grande número de estudos tem sido efectuado ao longo dos anos, numa tentativa de avaliar técnicas de diagnóstico laboratorial eficazes [100]. O diagnóstico desta infecção baseia-se na avaliação clínica, na detecção e identificação do seu agente etiológico e na utilização de testes serológicos para pesquisa de anticorpos.

Os diferentes tipos de testes serológicos são geralmente agrupados consoante a sua aplicação em teste de rastreio, de confirmação e de monitorização do resultado da terapêutica.

Esta forma de agrupamento resulta das diferenças existentes entre o tipo de anticorpos que pesquisam, da sua sensibilidade e especificidade, do início e da duração da sua reactividade, da manutenção ou não dessa reactividade após a terapêutica e da associação entre a reactividade e os diferentes estádios da infecção.

O presente estudo teve como objectivo avaliar testes serológicos utilizados na rotina para o diagnóstico laboratorial de sífilis, assim como um teste não comercializado (teste Signal-Spirolipin), determinando as respectivas sensibilidades e especificidades, pela comparação com o teste de imunofluorescência FTA-Abs [30, 73, 81, 105].

Pretendeu-se também avaliar uma técnica de PCR para pesquisa de DNA *T. pallidum* no soro numa vertente de verificar o seu potencial, como técnica a utilizar na detecção daquele microrganismo.

Os testes serológicos, utilizados na rotina, efectuados neste trabalho mostraram resultados semelhantes e parecem eficazes para um diagnóstico aceitável na maioria dos casos. Contudo, como esta doença apresenta fases sem sintomatologia e, como os testes não treponémicos acabam por negativar com a evolução da doença e os treponémicos mantêm a reatividade mesmo após a terapêutica, e como *T. pallidum* não é cultivável em meios de cultura, muitas vezes não se obtém um diagnóstico de certeza.

Apesar das limitações dos testes não treponémicos, pelo facto de apresentarem resultados falsos positivos e menor sensibilidade nas fases de sífilis primária e latente tardia ou

ainda causar falsos negativos em consequência do fenómeno prozona, mantem contudo a grande vantagem de permitir efectuar a monitorização do resultado da terapêutica.

O teste RPR estudado apresentou eficácia semelhante à obtida em outros estudos, demonstrando ser um teste que pode ser utilizado em situações de suspeita de infecção e no acompanhamento de doentes após a terapêutica. Apresenta ainda a vantagem de ser de fácil execução, não necessitar de grande equipamento e ser de leitura macroscópica. Por outro lado com o teste de TPHA estudado, obtiveram-se alguns resultados de falsa negatividade em doentes com sífilis latente, o que coloca o problema de alguns resultados terem de ser obrigatoriamente confirmados por outro teste treponémico.

Por não haver um teste *gold standard* como referência, muitos autores aconselham a utilização de dois testes treponémicos, descartando assim falsos positivos ou negativos.

Da comparação dos resultados obtidos, pode concluir-se que o teste Signal-Spirolipin apresentou uma boa sensibilidade e especificidade comparável à obtida pelos testes classicamente utilizados na rotina laboratorial. Este teste parece também ser útil para rastreio/confirmação da infecção sífilítica, tendo-se mesmo verificado apresentar uma melhor sensibilidade quando abordada a associação de teste não treponémico/teste treponémico. Trata-se de um teste de rápida execução, que não necessita de equipamento, sendo também de fácil leitura de resultado, e que pode ser efectuado em locais com poucos recursos para a realização dos testes tradicionais. Além disso, apresenta a grande vantagem de permitir a pesquisa de anticorpos anti-cardiolipina, ao contrário dos testes rápidos comumente utilizados que, apenas pesquisam anti-corpos treponémicos. Assim, a sua utilização poderá ser de grande utilidade para o clínico, a exercer em locais sem laboratório. Este teste permite o rastreio e confirmação da condição serológica do doente, possibilitando o diagnóstico de doença activa. Assim, quando for o caso, o clínico pode iniciar de imediato a terapêutica e notificar os parceiros.

Em relação as técnicas de PCR, estas, dada a sua maior sensibilidade e especificidade, têm sido frequentemente usadas no diagnóstico de doenças infecciosas, principalmente quando o microrganismo em questão não é cultivável *in vitro*.

Assim, para uma maior eficiência da técnica foi necessário optimizá-la, tendo-se utilizado para tal controlos positivos, constituídos por DNA de *T. pallidum*, estirpe de Nichols.

Neste estudo utilizou-se um método PCR multiplex com associação de dois pares de *primers*, na mesma mistura de reacção. A técnica parece demonstrar uma boa especificidade, visto não se ter observado amplificação nos grupos de doentes sem sífilis ou com sífilis tratada, no entanto a sensibilidade obtida foi baixa sobretudo nos estádios em que uma técnica deste tipo poderia ser uma grande utilidade para o diagnóstico. Actualmente técnicas de PCR em tempo-real, estão a ser aplicadas no diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas. Estas, geralmente apresentam uma maior sensibilidade pelo que, o desenvolvimento de uma técnica deste tipo poderá constituir uma mais-valia na detecção de *T. pallidum* em amostras clínicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aggarwal, K., Gupta, S., Jain, V. K. (2005).** Pustulocrustaceous secondary syphilis. *Acta Dermato-venereologica*. 85(4):378-9.
2. **Aiken, C. G. (1992).** HIV-1 infection and perinatal mortality in Zimbabwe. *Archives of Disease in Childhood*. 67(5):595-9.
3. **Ballard, R., Htun, Y., Fehler, G., Neilsen, G. (2000).** Syphilis. In: R. Ballard, Y. Htun, G. Fehler, G. Neilsen (Eds). *The diagnosis and management of sexually transmitted infections in Southern Africa* (pp. 19-28), 3rd. Center for Sexually Transmitted Diseases.
4. **Baughn, R. E., Musher, D. M. (2005).** Secondary syphilitic lesions. *Clinical Microbiology Reviews* 18 (1): 205-16.
5. **Becker, P. S., Akins, D. R., Radolf, J. D., Norgard, M. V. (1994).** Similarity between the 38-kilodalton lipoprotein of *Treponema pallidum* and the glucose/galactose-binding (MglB) protein of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 62 (4):1381-91.
6. **Berkow, R., Beers, M. H., Fletcher, A. J. (1997).** Enciclopédia Médica. Infecções. In: R. Berkow, M. H. Beers, A. J. Fletcher [Ed.lit]., vol. 11; (pp.101-105); ed. in Marck.
7. **Bissessor, M., Chen, M. (2009).** Syphilis, the great mimicker, is back. *Australian Family Physician*. 38(6): 384-7.
8. **Blanco, D. R., Miller, J. N., Lovett, M. A. (1997).** Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants. *Emerging Infectious Diseases* 3(1):11-20.

9. **Brar, B. K., Mehta, V., Raj, R. T. (2007).** Nodular secondary syphilis mimicking cutaneous lymphoreticular process. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.* 73 (6):437-8.
10. **Brinkman, M. B., McGill, M. A., Pettersson, J., Rogers, A., Matejková, P., Smajs, D., Weinstock, G. M., Norris, S. J., Palzkill, T. (2008).** A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin. *Infection and Immunity.* 76(5):1848-57.
11. **Brown, D. L., Frank, J. E. (2003).** Diagnosis and management of syphilis. *American family physician.* 68(2):283-90.
12. **Buffet, M., Grange, P. A., Gerhardt, P., Carlotti, A., Calvez, V., Bianchi, A., Dupin, N. (2007).** Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *The Journal of Investigative Dermatology.* 127(10):2345-50.
13. **Cameron, C. E., Brown, E. L., Kuroiwa, J. M., Schnapp, L. M., Brouwer, N. L. (2004).** *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins. *Journal of Bacteriology,* 186 (20): 7019– 7022.
14. **Castro, A. R., Mody, H. C., Parab, S. Y., Patel, M. T., Kikkert, S. E., Park, M. M., Ballard, R.C. (2010).** An immunofiltration device for the simultaneous detection of non-treponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. *Sexually Transmitted Infections.* 86 (7):532-6.
15. **Castro, R., Prieto, E., Aguas, M. J., Manata, M. J., Botas, J., Pereira, F. M. (2009).** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *Journal of Clinical Microbiology.* 47 (8): 2510-2512.

16. **Castro, R. (2004).** Infecção por *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem. Tese de Doutoramento pela Universidade Nova de Lisboa.
17. **Castro, R., Prieto, E. S., Santo, I., Azevedo, J., Exposto, F. da. L. (2003).** Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *Journal of Clinical Microbiology*.41 (1): 250-3.
18. **Castro, R., Prieto, E. S., Santo, I., Azevedo, J., Exposto, F. L. (2001).** Evaluation of the passive particle agglutination test in the serodiagnosis and follow-up of syphilis. *American journal of clinical pathologists*. 116:581-585.
19. **Castro, R., Prieto, E., Águas, M. J., Manata, M. J., Botas, J., Santo, I., Azevedo, J., pereira, F. L. H. (2007).** Detection of *Treponema pallidum* Sp *pallidum* DNA in latent syphilis. *International Journal of STD& AIDS*. 18:842-845.
20. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1999).** Primary and secondary syphilis--United States. *MMWR.Morbidity and Mortality Weekly Report*; 50(7):113-7.
21. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2009).** Primary and secondary syphilis - Jefferson county, Alabama, 2002-2007.*MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report*.58 (17):463-7.
22. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1998).** Primary and secondary syphilis--United States. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 47(24):493-7.
23. **Centurion-Lara A, Molini, B. J., Godornes, C., Sun, E., Hevner, K., Van Voorhis, W. C., Lukehart, S. A. (2006).**Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology* 44(9):3377-80.

24. **Cha, J. Y., Ishiwata, A., Mobashery, S. (2004).** A novel beta-lactamase activity from a penicillin-binding protein of *Treponema pallidum* and why syphilis is still treatable with penicillin. *The Journal of Biological Chemistry.* 279(15):14917-21.
25. **Cox, D. L., Chang, P., McDowall, A. W., Radolf, J. D. (1992).** The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity.* 60(3):1076-83.
26. **Croti, U. A., Gregori, F. Jr., Marcial, M. B., Dallan, L. A., Gregori, T. E., Oliveira, D. S. (2000).** Coronary bilateral ostial enlargement using the saphenous vein in a patient with syphilitic aortitis. *Brazilian Archives of Cardiology.* 74(2):153-8.
27. **Cruz, A. R., Pillay, A., Zuluaga, A. V., Ramirez, L. G., Duque, J. E., Aristizabal, G. E., Fiel-Gan, M. D., Jaramillo, R., Trujillo, R., Valencia, C., Jagodzinski, L., Cox, D. L., Radolf, J. D., Salazar, J. C. (2010).** Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *4(5): e 690.*
28. **Dave, S., Gopinath, D.V., Thappa, D.M. (2003).** Nodular secondary syphilis. *Dermatology Online Journal.* 9(1):9.
29. **de Melo, F .L., de Mello, J. C., Fraga, A. M., Nunes, K., Eggers, S. (2010).** Syphilis at the crossroad of phylogenetics and paleopathology. *5; 4(1):e575.*
30. **Deka, R. K., Brautigam, C. A., Yang, X. F., Blevins, J. S., Machius, M., Tomchick, D. R., Norgard, M. V. (2006).** The PnrA (Tp0319; TmpC) lipoprotein represents a new family of bacterial purine nucleoside receptor encoded within an ATP-binding cassette (ABC)-like operon in *Treponema pallidum*. *The Journal of Microbiology Chemistry.* 281(12):8072-81.

31. **Deka, R. K., Machius, M., Norgard, M. V., Tomchick, D. R. (2002).** Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(44):41857-64.
32. **Deka, R. K., Neil, L., Hagman, K. E., Machius, M., Tomchick, D. R., Brautigam, C. A., Norgard, M. V. (2004).** Structural evidence that the 32-kilodalton lipoprotein (Tp32) of *Treponema pallidum* is an L-methionine-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(53):55644-50.
33. **Diaz, T., Almeida, M. G., Georg, I., Maia, S. C., De Souza, R. V., Markowitz, L. E. (2004).** Evaluation of the Determine Rapid Syphilis TP assay using sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11(1):98-101.
34. **Dylewski, J., Duong, M. (2007).** The rash of secondary syphilis. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. 176 (1): 33-5.
35. **E, Gomez., D, J. Jespersen., J, A. Harring., M, J. Binnicker. (2010).** Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow Immunoassay for the Detection of IgM- and IgG-Class Antitreponemal Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(6):966-968.
36. **Evans, B. A., Bond, R. A., MacRae, K. D. (1998).** Racial origin, sexual behaviour, and genital infection among heterosexual men attending a genitourinary medicine clinic in London. *Sexually Transmitted Infections*. (1993-4).74(1): 40-4.
37. **Ferreira, W. F. C; Sousa, J. C. F. (2000).** *Microbiologia*. In: W.F.C. Ferreira, J.C.F. Sousa (Eds). Vol. 2; *Treponema*. (pp.259-269). LIDEL, Lisboa.
38. **Finelli, L., Berman, S. M., Koumans, E. H., Levine, W. C. (1998).** Congenital syphilis. *Bulletin of the World Health Organization*. 76 Suppl 2:126-8.

39. **Flores, J. L. (1995).** Syphilis. A tale of twisted treponemes. *The Western Journal of Medicine.* 163(6):552-9.
40. **Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., et al. (1998).** Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science (New York).* 281(5375):375-88.
41. **French, P. (2007).** Syphilis. *BMJ (Clinical Research Ed.).* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3/334\(7585\):143-7](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3/334(7585):143-7). No abstract available. Erratum in: *BMJ.* 2007 335(7617):0.
42. **French, P., Gomberg, M., Janier, M., Schmidt, B., van, Voorst. Vader. P., Young, H. (2009).** IUST: European Guidelines on the Management of Syphilis. *International Journal of STD & AIDS.* 20(5):300-9.
43. **Giacani, L., Sambri, V., Marangoni, A., Cavrini, F., Storni, E., Donati, M., Corona, S., Lanzarini, P., Cevenini, R. (2005).** Immunological evaluation and cellular location analysis of the TprI antigen of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infection and Immunity.* 73(6):3817-22.
44. **Goh, B. T. (2005).** Syphilis in adults. *Sexually transmitted infections.* 81(6):448-52.
45. **Goh, B. T., Thornton, A .C. (2007).** Antenatal screening for syphilis. *Sexually Transmitted Infections.* 83(5):345-6.
46. **Goldmeier, D. (2000).** Tertiary syphilis. *Sexually Transmitted Infections.* 76 (3): 222-3.
47. **Habib, M. (2009).** La Polémique Sur L' Histoire de la Syphilis. *La Tunisie Médicale.* 87(04): 237-239.

48. **Habib, M. (2009).** The controversy over the history of syphilis. 87(8):491-3.
49. **Habib, M. (2009).** The discovery of penicillin: a revolution in the treatment of syphilis. 87 (6):369-71.
50. **Hagedorn, H. J., Kraminer-Hagedorn, A., De Bosschere, K., Hulstaert, F., Pottel, H., Zrein, M. (2002).** Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*.40 (3):973-8.
51. **Hagman, K. E., Porcella, S. F., Popova, T. G., Norgard, M. V. (1997).** Evidence for a methyl-accepting chemotaxis protein gene (mcp1) that encodes a putative sensory transducer in virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*.65 (5):1701-1709.
52. **Hambie, E. A., Larsen, S. A., Perryman, M. W., Pettit, D. E., Mullally, R. L., Whittington, W. (1983).** Comparison of a new rapid plasma reagin card test with the standard rapid plasma reagin 18-mm circle card test and the venereal disease research laboratory slide test for serodiagnosis of syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*. 17: 249-254.
53. **Handtrack, C., Knorr, H., Amann, K. U., Schoerner, C., Hilgers, K. F., Geissdörfer, W. (2008).** Acute syphilitic chorioretinitis after a missed primary diagnosis: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 1; 2:33.
54. **Harper, K. N., Ocampos, P. S., Steiner, B. M., George, R.W., Silverman, M. S., Bolotin, S., Pillay, A., Sauders, N. J., Armelagos, G. J. (2008).** On the origin of the treponematoses: a phylogenetic approach. 15; 2(1): e 148.

55. **Hazlett, K. R., Cox, D. L., Decaffmeyer, M., Bennett, M. P., Desrosiers, D. C., La Vake, C. J., La Vake, M. E., Bourell, K. W., Robinson, E. J., Brasseur, R., Radolf, J. D. (2005).** TP0453, a concealed outer membrane protein of *Treponema pallidum*, enhances membrane permeability. *Journal of Bacteriology*. 187(18): 6499-508.
56. **Heymans, R., van der, Helm. J. J., de Vries, H. J., Fennema, H. S., Coutinho, R. A., Bruisten, S. M. (2010).** Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *Journal of Microbiology*.48 (2):497-502.
57. **Hook, E. W. 3rd. (1999).** Elimination of syphilis transmission in the United States: historic perspectives and practical considerations. *Transactions of the American clinical and Climatological Association*. 110:195-203; discussion 203-4.
58. **Hossain, A. (1986).** Serological tests for syphilis in Saudi Arabia. *Genitourinary Medicine*. 62(5):293-7.
59. (<http://pt.wikipedia.org>). <http://www.xtimeline.com/evt/view.aspx?id=322304>. Data da consulta 21/06/2011.
60. http://www.portalangop.co.ao/motix/pt_pt/noticias/saude/2007/11/50/impossivel-tratar-sifilis-com-remedios-caseiros,50d4478c-be38-456c-b66a-6f6c4e304410.html. Data da consulta 14/4/ 2011.
61. <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/sifilis/sifilis-10.php>. Data da consulta 03/10/2012.
62. <http://angola-africa.forum-ativo.com/t451p20-luanda-sul-noticias-frescas>. Data da consulta 14/4/ 2011.

63. <http://thehealthscience.com/wiki/Image:Spirochete-Treponema-pallidum.jpg>.
Data da consulta 03/10/2012.
64. **Johnson, R. C., Ritzi, D. M., Livermore, B. P. (1973).** Outer envelope of virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*.59(1):453-456.
65. **Johnson, R. C., Ritzi, D. M., Livermore, B. P. (1973).** Outer envelope of virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*. 8(2):291-5.
66. **Jun, H. K., Kang, .Y. M., Lee, H. R., Lee, S. H., Choi, B. K. (2008).** Highly conserved surface proteins of oral spirochetes as adhesins and potent inducers of proinflammatory and osteoclastogenic factors. *Infection an Immunity*.76 (6): 2428-38.
67. **Kamb, M. L., Newman, L. M., Riley, P. L., Mark, J., Hawkes, S. J., Malik, T., Broutet, N. (2010).** A road map for the global elimination of congenital syphilis.*Obstetrics and Gynecology International*. pii: 312798.
68. **Kim, J., Kim, W. H., Cho, C., Kim, J., Kim, G. Y., Nam, M. H., Kim, J. S., Bae, S. Y., Cho, Y. (2008).** [Evaluation of automated architect syphilis TP as a diagnostic laboratory screening test for syphilis]. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 28(6):475-82.
69. **King, K., Holmes, I., at al. (1999).** *Sexually Transmitted Diseases*. Third Edition. By the McGraw-Hill companies. United States of America. (Pp.467-513; 1165-1186).

70. **King, K. Holmes., P, Frederick. Sparling., Walter, E. Stamm., Peter, Pior., Judith, N. Wasserheit., Lawrence, Corey., Myron, S. Cohen., D, Heather. Watts. (2008).** Sexually Transmitted Diseases. 4^a Edition. By the McGraw-Hill companies. United States of America. (Pp.661-667).
71. **Knell, R. J. (2004).** Syphilis in Renaissance Europe: rapid evolution of an introduced sexually transmitted disease. *Proceedings Biological Sciences/The Royal Society*. 2004 May 7; 271 Suppl 4:S174-6.
72. **Kolman, C. J., Centurion-Lara, A., Lukehart, S. A., Owsley, D. W., Tuross, N. (1999).** Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. *180(6):2060-3*.
73. **Koneman, E. M., Allen, S. D; Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. Jr. (2001).** *Diagnostico Microbiologico-Texto e Atlas Colorido* (pp.966-975), Ed. 5^a. Editora: Médica e Científica, Ltda. Rio de Janeiro.
74. **Lafond, R. E., Lukehart, S. A. (2006).** Biological basis for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(1):29-49.
75. **LaFond, R. E., Centurion-Lara, A., Godornes, C., Van, Voorhis. W. C., Lukehart, S. A. (2006).** TprK sequence diversity accumulates during infection of rabbits with *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain. *Infection and Immunity*. 74(3):1896-906.
76. **Larsen, S.A., Steiner, B. M., Rudolph, A. H. (1995).** Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical Microbiology Rev*.8:1-21.
77. **Lee, V., Kinghorn, G. (2008).** Syphilis: an update. *Clinical Medical (London, England)*.8(3):330-3.

78. **Lesiński, J., Krach, J., Kadziewicz, E. (1974).** Specificity, sensitivity, and diagnostic value of the TPHA test. *The British Journal of Venereal Diseases.* 50(5):334-40.
79. **Lewis, D. A., Young, H. (2006).** Syphilis. *Sexually transmitted infections.* 82 Suppl 4:iv13-5.
80. **Liu, H., Rodes, B., Chen, C. Y., 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.
81. **Lomotey, C. J., Lewis, J., Gebrian, B., Bourdeau, R., Dieckhaus, K., Salazar, J. C. (2009).** Maternal and congenital syphilis in rural Haiti. *Pan American Journal of the Public Health.* 26(3):197-202.
82. **Mabey, D., Peeling, R. W., Ballard, R., Benzaken, A. S., Galbán, E., Changalucha, J., Everett, D., Balira, R., Fitzgerald, D., Joseph, P., Nerette, S., Li, J., Zheng. (2006).** Prospective, multi-centre clinic-based evaluation of four rapid diagnostic tests for syphilis. *Sexually Transmitted Infections.* 82 Suppl 5:v13-6.
83. **Machius, M., Brautigam, C. A., Tomchick, D. R., Ward, P., Otwinowski, Z., Blevins, J. S., Deka, R.K., Norgard, M.V.(2007).** Structural and biochemical basis for polyamine binding to the Tp0655 lipoprotein of *Treponema pallidum*: putative role for Tp0655 (TpPotD) as a polyamine receptor. *Journal of Molecular Biology.* 26; 373(3):681-94.
84. **Marrazzo, J. (2007).** Syphilis and other sexually transmitted diseases in HIV infection. 15(1): 11-6.

85. **Marangoni, A., Sambri, V., Accardo, S., Cavrini, F., D'Antuono, A., Moroni, A., Storni, E., Cevenini, R. (2005).** Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12(10):1231-4.
86. **Marfin, A. A., Liu, H., Sutton, M. Y., Steiner, B., Pillay, A., Markowitz, L. E. (2001).** Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagnosis Microbiology of Infectious Diseases*. 40:163-166.
87. **Martin, I. E., Gu, W., Yang, Y., Tsang, R. S. (2009).** Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 49(4):515-21.
88. **Matejková, P., Flasarová, M., Zákoucká, H., Borek, M., Kremenová, S., Arenberger, P., Woznicová, V., Weinstock, G. M., Smajs, D. (2009).** Macrolide treatment failure in a case of secondary syphilis: a novel A2059G mutation in the 23S rRNA gene of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Journal of Medical Microbiology*. 58(Pt 6):832-6.
89. **Maves, R. C., Cachay, E. R., Young, M. A., Fierer, J. (2008).** Secondary syphilis with ocular manifestations in older adults. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 46 (12): e142-5.
90. **Molepo, J., Pillay, A., Weber, B., Morse, S.A., Hoosen, A. A. (2007).** Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sexually Transmitted Infections*. 83(3):189-92.

91. **Naaber, P., Makoid, E., Aus, A., Loivukene, K., Poder, A. (2009).** Evaluation of ID-PaGIA syphilis antibody test. *Indian Journal of Dermatology, Venorology and Leprology.* 75(5):492-4.
92. **Norris, S. J., Weinstock, G. M. (2000).** The genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? *Current Opinion in Infect Diseases.* 13(1):29-36.
93. **O'Neill, P. (1976).** A new look at the serology of treponemal disease. *The British Journal of Venereal Diseases.* 52(5):296-9.
94. **Orle, K. A., Gates, C. A., Martin, D.H., Body, B. A., Weiss, J. B. (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.
95. **Peeling, R. W., Hook, E. W. 3rd. (2006).** The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. *The Journal of Pathology.* 208(2):224-32.
96. **Pillay, A., Liu, H., Chen, C.Y., Holloway, B., Sturm, A. W., Steiner, B., Morse, S. A. (1998).** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sexually Transmitted Diseases.* 8:408-414.
97. **Pleimes, M., Hartschuh, W., Kutzner, H., Enk, A. H., Hartmann, M. (2009).** Malignant Syphilis with Ocular Involvement and Organism-Depleted Lesions. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1; 48(1):83-5.

98. **Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J., Gherardini, F. C. (1999).** Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96(19):10887-9.
99. **Radolf, J. D., Robinson, E. J., Bourell, K. W., Akins, D. R., Porcella, S. F., Weigel, L. M., Jones, J. D., Norgard, M. V. (1995).** Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infection and Immunity.* 63(11):4244-52.
100. **Ratnam, S. (2005).** The laboratory diagnosis of syphilis. *The Canadian journal of infectious disease & medical microbiology.* 16(1):45-51.
101. **Riley, B.S., Oppenheimer-Marks, N., Hansen, E. J., Radolf, J. D., Norgard, M. V. (1992).** Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. *The Journal of infectious diseases.* 165(3):484-93.
102. **Rodes, B., Liu, H., Johnson, S., George, R., Steiner, B. (2000).** Molecular cloning of a gene (poIA) coding for an unusual DNA polymerase I from *Treponema pallidum*. *Journal of Medical Microbiology.* 49 (7):657-67.
103. **Rodrigo, F.G., Silva, A. M. (2003).** Sífilis. In: F.G. Rodrigo, A.M. Silva (Eds). *Doenças Transmitidas Sexualmente: Dermatologia e Venereologia* (pp.45-70). LIDEL, Lisboa.
104. **Rothschild, B. M. (2005).** History of syphilis. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.*(10):1454-63.

105. **Salazar, J. C., Rathi, A., Michael, N. L., Radolf, J. D., Jagodzinski, L. 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(6):2954-2958.
106. **Sandra, Larsen. A., Pope, Victoria. Johnson, Robert. E., Kennedy, Eduard. J. (1998).** Syphilis. In: S. A. Larsen, V. pope, R. E. Johnson, E. J. Kennedy. JR (Eds). *A Manual of Tests*.(pp.2-95), 9th Edition. American Public Health Association. Washington.
107. **Saraiva, R. S., César, C. A., Mello, M. A. (2010).** Syphilitic aortitis: diagnosis and treatment. Case report. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular: órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 25(3):415-8.
108. **Shimanskaya, I., Zhurauskaya, L., Pankratov, O., Unemo, M., Ballard, R., Domeika, M. (2011).** Evaluation of Three Serological Tests Manufactured in Belarus for the Diagnosis of Syphilis. 2340/00015555-1056.
109. **Silva, M. I. M. M. (2009).** Contribuição para o estudo de Identificação e Genotipagem de *Treponema pallidum* subsp.pallidum em amostras clínicas. *Dissertação de Mestrado pela Universidade de Lisboa*.
110. **Stamm, L. V., Parrish, E. A. (1994).** Characterization of the low-molecular-mass proteins of virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*. 62(1):271-9.
111. **Stoner, B. P. (2007).** Current Controversies in the Management of adult Syphilis. *Clinical Infectious Diseases: an official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 44:S130–46.

112. **Su, S. J., Huang, S., Chung, C. Y., Yang, H. M., Chow, Y. O. (1990).** Evaluation of the equivocal test results of *Treponema pallidum* haemagglutination assay. *Journal of Clinical Pathology*. 43(2):166-7.
113. **Sutton, M. Y., Liu, H., Steiner, B., Pillay, A., Mickey, T., Finell, L., Morse, S., Markowitz, L.E., Louis, M. E. St. (2001).** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona Country with increasing syphilis morbidity: Use of specimens from ulcers and blood. *The Journal of Infectious Diseases*. 183:1601-1606.
114. **ul, Bari. A., Raza, N. (2006).** Secondary syphilis clinically mimicking pseudolymphoma of the face. *Dermatology Online Journal*.12(3):20.
115. **Van, Vranken. M. (2007).** Prevention and treatment of sexually transmitted diseases: an update. *American family physician*. 76 (12):1827-32.
116. **Villazón-Vargas, N., Conde-Glez, C. J., Juárez-Figueroa, L., Uribe-Salas, F. (2009).** [Evaluation of a rapid diagnostic test to assess the prevalence of maternal syphilis in Bolivia]. *Revista Médica de Chile*. 137(4):515-21.
117. **Weigel, L. M., Brandt, M. E., Norgard, M. V. (1992).** Analysis of the N-terminal region of the 47-kilodalton integral membrane lipoprotein of *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*. 60(4):1568-76.
118. **Welch, R. J., Litwin, C. M. (2010).** Evaluation of two immunoblot assays and a Western blot assay for the detection of antisyphilis immunoglobulin g antibodies. *Clinical and Vaccin Immunology: CVI*.17 (1):183-4.
119. **West, B., Walraven, G., Morison, L., Brouwers, J., Bailey, R. (2002).** Performance of the rapid plasma reagin and the rapid syphilis screening tests in the diagnosis of syphilis in field conditions in rural Africa. *Sexually Transmitted Infections*.78 (4):282-5.

120. **Woods, C. R. (2005).** Seminars in Pediatric Infectious Diseases. Syphilis in children: congenital and acquired. 16(4):245-57.

121. **Workowski, K. A., Berman, S. (2010).** Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). MMWR Recommendations and Reports: Mobility and Mortality Weekly Report. 59(RR-12):1-

122. **Zetola, N. M., Engelman, J., Jensen, T. P., Klausner, J. D. (2007).** Syphilis in the United States: an update for clinicians with an emphasis on HIV coinfection. Mayo Clinic Proceedings. 82(9): 1091-102.